

# Neue Wege zur rekombinanten Oligomerisierung von Peptiden und Proteinen über den mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplex

Vom Fachbereich Biologie  
der Technischen Universität Darmstadt  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

*Doctor rerum naturalium*

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Matin Daneschdar

aus Göttingen

Referent: Prof. Dr. Harald Kolmar

Korreferent: Prof. Dr. Markus Engstler

Tag der Einreichung: 20. September 2010

Tag der mündlichen Prüfung: 12. November 2010

Darmstadt 2010

D 17

## I. Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Etablierte Methoden zur Konjugation von Peptiden und Proteinen</b>	<b>3</b>
1.1.1. Chemische Oligomerisierung von Proteinen und Peptiden	3
1.1.2. Rekombinante Oligomerisierung von Proteinen und Peptiden	7
<b>1.2. Der mitochondriale Tim10/Tim9-Komplex</b>	<b>9</b>
1.2.1. Der mitochondriale Import von Proteinen	9
1.2.2. Die Struktur des mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplexes	11
<b>1.3. Oligomerisierung von Passagierdomänen über den mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplex</b>	<b>14</b>
<b>1.4. Zielsetzung</b>	<b>15</b>
<b>2. Materialien</b>	<b>16</b>
<b>2.1. Organismen und Plasmide</b>	<b>16</b>
2.1.1. Organismen	16
2.1.2. Plasmide	16
<b>2.2. Oligonukleotide</b>	<b>20</b>
<b>2.3. DNA- und Proteinlängenstandards</b>	<b>21</b>
<b>2.4. Puffer und Lösungen</b>	<b>22</b>
<b>2.5. Kommerziell erhältliche Systeme</b>	<b>23</b>
<b>2.6. Kulturmedien</b>	<b>24</b>
<b>2.7. Chemikalien, Enzyme und Antikörper</b>	<b>24</b>
<b>2.8. Geräte und sonstige Materialien</b>	<b>25</b>
<b>2.9. Datenverarbeitungsprogramme</b>	<b>27</b>
<b>3. Methoden</b>	<b>29</b>
<b>3.1. Mikrobiologische Arbeiten</b>	<b>29</b>
3.1.1. Vorbereitung von Geräten und Lösungen	29
3.1.2. Anzucht und Vermehrung von <i>Escherichia coli</i> Stämmen	29
3.1.3. Lagerung von <i>Escherichia coli</i> Stämmen	29
3.1.4. Präparation und Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen durch Elektroporation	29
<b>3.2. Molekularbiologische Arbeiten</b>	<b>30</b>
3.2.1. Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen mit Ethanol	30
3.2.2. Extraktion von DNA aus wässrigen Lösungen mit organischen Lösungsmitteln	31
3.2.3. Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese	32
3.2.4. Reinigung von DNA aus Agarosegelen mit Hilfe des WizardSV Gel and PCR Clean-Up Systems (Promega)	32
3.2.5. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	33
3.2.6. Bestimmung der Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen	33
3.2.7. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	33
3.2.8. Ligation von DNA-Fragmenten	33
3.2.9. Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
<b>3.3. Proteinchemische Arbeiten</b>	<b>35</b>

3.3.1. Expressionsanalyse ausgewählter Klone .....	35
3.3.2. Expression solitärer Tim10- und Tim9-Untereinheiten .....	36
3.3.3. Bicistronische oder duale Expression funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe .....	37
3.3.4. Aufschluss von <i>Escherichia coli</i> -Zellen mittels French® Press .....	37
3.3.5. Konzentration von Proteinen durch Ultrafiltration .....	37
3.3.6. Bestimmung der Proteinkonzentration in wässrigen Lösungen .....	38
3.3.7. Spaltung von rekombinant synthetisierten Proteinen mit TEV-Protease .....	38
3.3.8. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	38
3.3.9. Blau-native Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) .....	39
3.3.10. Western-Blot-Analyse .....	40
3.3.11. Messung von Protein-Protein-Wechselwirkungen durch Biolayer Interferometrie .....	41
<b>3.4. Säulenchromatographie .....</b>	<b>44</b>
3.4.1. Isolierung von GST-Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i> -Zellextrakten durch Glutathionaffinitätschromatographie .....	44
3.4.2. Isolierung von Proteinen mit Polyhistidin-tag aus <i>E. coli</i> -Zellextrakten durch immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) .....	44
3.4.3. Gelfiltrationschromatographie .....	45
<b>3.5. Zellkulturarbeiten .....</b>	<b>46</b>
3.5.1. Kultivierung von M-07e Zellen .....	46
3.5.2. Kultivierung von M-07e Zellen aus einer Gefrierkultur .....	46
3.5.3. Bestimmung der Zellzahl mittels Thoma Zählkammer (Ausschlussfärbung) ....	46
3.5.4. Zellproliferationsanalyse .....	46
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
<b>4.1. Aufbau eines universellen rekombinanten Syntheseverfahrens zur Bereitstellung funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe .....</b>	<b>48</b>
4.1.1. Untersuchungen zur singulären Expression von Tim9- und Tim10-Untereinheiten .....	48
4.1.2. Untersuchungen zur bicistronischen Expression funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe .....	53
4.1.3. Untersuchungen zur dualen Expression funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe .....	63
<b>4.2. Untersuchungen zur biologischen Aktivität funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe .....</b>	<b>70</b>
4.2.1. Untersuchungen zu monospezifischen funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexen .....	70
4.2.1.1 Konzeption, Klonierung und Expression der funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe .....	72
4.2.1.2 Bindungsuntersuchungen an VEGFR-2 .....	74
4.2.2. Untersuchungen zu bispezifischen funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexen .....	76
4.2.2.1. Konzeption, Klonierung und Expression der funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe .....	78
4.2.2.2 Bindungsuntersuchungen an den ErbB2-Rezeptor und VEGFR-2 .....	80
4.2.3. Untersuchungen zur Oligomerisierung von Mikroproteinen .....	83

4.2.3.1. Konzeption, Klonierung und Expression der funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe .....	84
4.2.3.2 Bindungsuntersuchungen an den TPO-Rezeptor .....	87
4.2.3.3 Untersuchungen zur Induktion der Proliferation von M-07e-Zellen .....	89
<b>4.3. Spezifische chemische Konjugation funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe .....</b>	<b>92</b>
4.3.1. Herstellung von Tim10/Tim9-Komplex-Varianten mit N-terminalen Serin.....	93
4.3.2. Konjugation von Fluorescein-5-Thiosemicarbazid .....	95
<b>5. Diskussion und Ausblick.....</b>	<b>101</b>
<b>5.1. Diskussion .....</b>	<b>101</b>
5.1.1. Aufbau eines universellen rekombinanten Syntheseverfahrens zur Bereitstellung funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe.....	101
5.1.2. Untersuchungen zur biologischen Aktivität funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe.....	105
5.1.3. Spezifische chemische Konjugation funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe .....	113
<b>5.2. Ausblick.....</b>	<b>115</b>
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>117</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>119</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>132</b>
8.1. Abkürzungsverzeichnis .....	132
8.2. Veröffentlichungen .....	134
8.3. Danksagung .....	135
8.4. Eidesstattliche Erklärung .....	136
8.5. Lebenslauf .....	137



### 1. Einleitung und Zielsetzung

Der älteste bisher gefundene Nachweis für lebende Organismen auf der Erde wurde auf ca. 3,5 Mrd. Jahre datiert [1]. Bei den Fossilien handelte es sich um Populationen von Cyanobakterien, welche in Kolonien einen Biofilm von ca. 1-10 mm Dicke bilden, die ihrerseits zu sogenannten Stromatolithen aufgeschichtet sind [2]. Neueste Funde zeigen, dass Einzellerpopulationen schon relativ früh, im Paläoproterozoikum, ein gemeinsames koordiniertes Wachstum aufzeigen konnten [3], also in einer Periode des Erdzeitalters in der die Sauerstoffanreicherung in der Atmosphäre noch nicht vollständig abgeschlossen war [4].

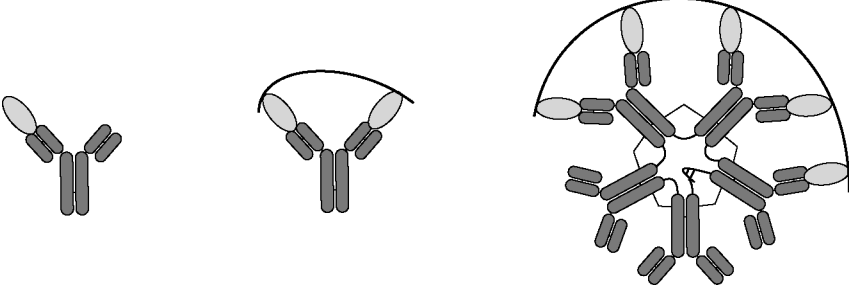
Der Zusammenschluss von Einzellern zu einem gemeinsam koordinierten Wachstum oder der einfache Austausch von Informationen unter den Zellen einer Einzellerpopulation birgt viele Vorteile [5]. Mit einem einfachen Informationsaustausch können sich Populationen an bestimmte Umweltsituationen anpassen oder sich bei einem koordinierten Wachstum z.B. vegetative und reproduktive Arbeiten teilen [5]. Unter Einzellern ist ein einfaches System zur Signalweiterleitung zwischen einzelnen Zellen einer Population bekannt, das *Quorum Sensing*. Dieses ermöglicht den Einzellern durch *Autoinducer* z.B. eine konzentrationsabhängige Pathogenität auszubilden [6], eine konzentrationsabhängige Biofilmbildung [7, 8] oder eine Inhibition des Hyphenwachstums [9]. Je komplexer ein Organismus aufgebaut ist, desto komplexer wird diese Koordination, welche für ein Wachstum und dem Fortbestand des Organismus notwendig ist.

Bei vielzelligen Organismen wie Tieren und Pflanzen ist es notwendig, dass jede Zelle ihren vorgesehenen Platz im Organismus einnimmt und z.B. nur situationsbedingt Proteine exprimiert oder sich teilt. Eine solche Koordination der einzelnen Zellen in einem Organismus wird durch Signalmoleküle und Rezeptoren gewährleistet, die eine Signaltransduktion ermöglichen [10]. Wie essenziell diese Art von Kontrolle ist, wird z.B. bei einer Krebserkrankung verdeutlicht. Hier ist die Kontrolle über die Proliferation einer Zelle gestört [10]. Aufgrund der zentralen Bedeutung der Signaltransduktion, bietet sich diese als Angriffspunkt in der molekularen Wirkstoffforschung zur Bekämpfung verschiedener Krankheiten an.

## 1. Einleitung und Zielsetzung

Die Struktur der in der Signaltransduktion involvierten Rezeptoren und deren Effektormolekülen ist je nach Gegebenheit sehr unterschiedlich. Während bei einigen Rezeptoren das Binden eines Signalmoleküls hinreichend ist, benötigen andere Rezeptoren Bindungspartner mit mehreren Valenzen zur Aktivierung, da eine Signalweiterleitung zum Beispiel von der Oligomerisierung verschiedener Rezeptoruntereinheiten abhängig sein kann. Dazu gehören z.B. die Rezeptoren einiger Wachstumsfaktoren wie dem endothelialen Wachstumsfaktor [11, 12], dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor [13, 14], dem CD40 Rezeptor [15, 16] oder dem Thrombopoietinrezeptor (cMpl) [17]. Durch die vorrausgehende Oligomerisierung der Signalmoleküle ist eine zielgenaue und sehr spezifische Induktion eines Signalweges möglich. Generell sind polyvalente Bindungen in der Natur weit verbreitet [18]. Auch die bei einer Immunantwort im Körper hergestellten Antikörper zeigen mehrere Valenzen auf. Dadurch wird eine sehr hohe Avidität zu den Bindepartnern generiert (Tabelle 1.1).

**Tabelle 1.1:** Zusammenhang zwischen der Anzahl effektiver Valenzen und der Gleichgewichtskonstante. Modifiziert nach [www.cartage.org.lb](http://www.cartage.org.lb).



IgG	IgG	IgM	Antikörper
1	2	5	effektive Valenzen
1	100	$10^4$ - $10^5$	rel. Gleichgewichtskonstante

Die Generierung multivalenter Liganden spielt in der modernen Wirkstoffforschung eine zunehmend wichtige Rolle, aufgrund dessen wurden verschiedene Verfahren zur Konjugation von Proteinen und Peptiden etabliert. Somit ist es z.B. möglich, durch Dimerisierung aus einem potenziellen Antagonisten eines Induktors einen Agonisten zu generieren [19] oder durch Anbieten mehrerer Valenzen eine höhere Bindungsaffinität zu erreichen [18]. Stemmer und Kollegen haben für eine neue Art dieser Bindemoleküle den Namen Avimer (*avidity multimer*) etabliert [20, 21]. Diese nicht-Immunoglobulin-

Bindemoleküle bestehen aus einzelnen Domänen, die jede für sich eine relativ geringe Affinität zu dem Zielprotein aufweisen. Allerdings resultiert aus dem Aviditätseffekt des Oligomers eine starke Bindung. Durch Oligomerisierung kann zudem eine höhere strukturelle Stabilität oder die Generierung bifunktionaler Moleküle erreicht werden [22].

Bei den etablierten Verfahren zur Konjugation von Peptiden und Proteinen handelt es sich vor allem um chemische Methoden. Neben der meist einfachen Oligomerisierung ermöglichen die chemischen Methoden die Oligomerisierung sowohl rekombinanter, nativer als auch chemisch synthetisierter Peptide und Proteine. Demgegenüber steht nur eine geringe Anzahl an rekombinanten Oligomerisierungsmethoden. Die rekombinanten Oligomerisierungsverfahren ermöglichen unter anderem die Oligomerisierung komplexer Proteine direkt bei deren Expression und zudem eine gerichtete Oligomerisierung über definierte Oligomerisierungsdomänen. Jedoch ist meist keine Heterooligomerisierung mit jeweils mehreren Bindevalenzen möglich und eine gerichtete spezifische chemische Funktionalisierung z.B. mit Chromophoren ist nicht immer realisierbar oder überhaupt angedacht.

In dieser Arbeit soll ein neues rekombinantes Oligomerisierungsverfahren über den mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplex etabliert werden. Das Verfahren soll die Generierung bispezifischer und bifunktionaler Oligomere, sowie eine gerichtete spezifische chemische Funktionalisierung ermöglichen. Die folgenden Abschnitte erläutern etablierte chemische und rekombinante Oligomerisierungsmethoden und stellen ein neues Verfahren zur rekombinanten Oligomerisierung über den mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplex vor.

### **1.1. Etablierte Methoden zur Konjugation von Peptiden und Proteinen**

#### **1.1.1. Chemische Oligomerisierung von Proteinen und Peptiden**

Eine weit verbreitete Methode zur Konjugation von Proteinen und Peptiden ist die chemische Konjugation durch quervernetzende Substanzen, den sogenannten *Crosslinkern*. Das Vernetzen beruht dabei auf der Reaktion der *Crosslinker* mit verschiedenen Seitenketten der Proteine. Somit hängt die Konjugation nicht nur von dem eingesetzten *Crosslinker* ab, sondern auch von der

## 1. Einleitung und Zielsetzung

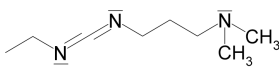
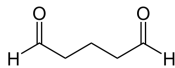
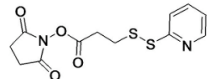
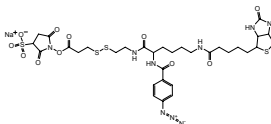
Aminosäurezusammensetzung der Proteine. Liegt eine betroffene Aminosäureseitenkette in einem für die Funktion des Proteins essenziellen Bereich, so ist eine Konjugation ohne weiteres nicht möglich. Daher wurden in den letzten Jahren neue Verfahren zur gerichteten Konjugation entwickelt. Diese beruhen auf speziellen Grundgerüsten, welche eine vorgegebene Anzahl an Konjugationsseiten zur Verfügung stellen. Betrachten wir zunächst die ungerichtete Konjugation von Proteinen und Peptiden.

### Ungerichtete Konjugation von Proteinen und Peptiden

Die ungerichtete Konjugation von Proteinen und Peptiden ist in der Biotechnologie und der molekularen Wirkstoffforschung weit verbreitet. So wird zum Beispiel seit den späten 1960er Jahren Konjugate aus Antikörpern und Enzymen hergestellt, wie sie z.B. bei der Immunodetektion einer Western-Blot Analyse verwendet werden. Dabei werden die reaktiven Substanzen formal in *Zero-Length*, homobifunktionale, heterobifunktionale und trifunktionale *Crosslinker* eingeteilt [23]. Eine Übersicht über gängige *Crosslinker* ist in Tabelle 1.2 dargestellt.

Als *Zero-Length Crosslinker* versteht man reaktive Substanzen, welche Proteine miteinander vernetzen können ohne selbst weitere Atome hinzuzufügen. Somit ist ein Atom eines Bindungspartners direkt mit einem Atom eines anderen verbunden.

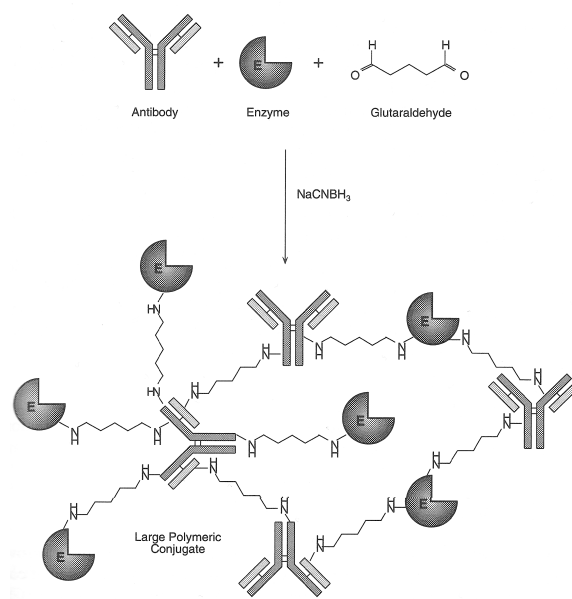
Tabelle 1.2: Übersicht über gebräuchliche chemische Konjugationsreagenzien.

Crosslinkertyp	Valenzen	Anwendung	Beispiel	Strukturformel	Literatur
<i>Zero-Length</i>	2	Hetero- und Homodimerisierung	EDC		[24-28]
Homobifunktional	2	Homodimerisierung	Glutaraldehyd		[29-31]
Heterobifunktional	2	Hetero- und Homodimerisierung	SPDP		[32]
Trifunktional	3	Hetero- und Homotrimerisierung	Sulfo-SBED		[33, 34]

Zu den *Zero-Length Crosslinkern* gehören z.B. die Carbodiimide wie 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid Hydrochlorid (EDC), 1-Cyclohexyl-3-(2-Morpholinoethyl) Carbodiimid (CMC) und Dicyclohexyl Carbodiimid (DCC). Das

bekannteste Beispiel eines *Zero-Length Crosslinkers* ist das wasserlösliche EDC. Zusammen mit dem N-Hydroxysulfo-Succinimid (Sulfo-NHS) wird es zum Beispiel zur Kopplung von Proteinen an aminoreaktive Oberflächen verwendet. Das Sulfo-NHS dient dabei als Stabilisator eines Intermediats aus der Reaktion des EDC mit einer Carboxylgruppe unter der Bildung eines Sulfo-NHS-Esterintermediats. Somit kann die Ausbeute an Amidbindungen bei der Konjugation erhöht werden.

Unter bestimmten Umständen kann die Verwendung von *Zero-Length Crosslinkern* nicht möglich sein, zum Beispiel, wenn die Funktion eines Enzyms oder die Bindung eines Antikörpers durch die räumliche Nähe des Bindungspartners beeinträchtigt ist. In diesen Fällen werden *Crosslinker* mit einem Abstandshalter zwischen den reaktiven Gruppen verwendet. Die einfachste Form dieser *Crosslinker* sind die homobispezifischen *Crosslinker*. Diese tragen auf beiden Seiten dieselbe reaktive Gruppe. Neben den homobispezifischen wurden auch heterobispezifische und trispezifische *Crosslinker* beschrieben (Tabelle 1.2). Einer der bekanntesten homobispezifischen *Crosslinker* ist das Glutaraldehyd. Glutaraldehyd kann auf verschiedene Weise mit einem Molekül reagieren, wobei der genaue Reaktionsmechanismus noch nicht beschrieben wurde [23]. Auf Grund der Abundanz der reaktiven Gruppen bei einem Protein kommt es oft zur Ausbildung von hochmolekularen Aggregaten, welche vor allem bei der Verwendung von homobispezifischen *Crosslinkern* auftreten (Abbildung 1.1).

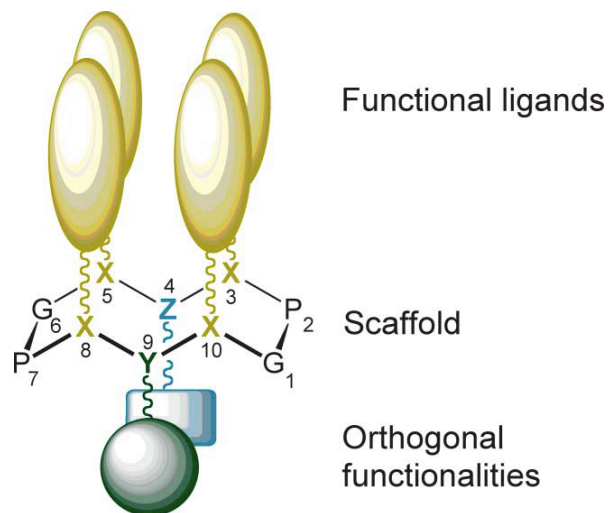


**Abb. 1.1:** Ausbildung hochmolekularer Aggregate durch Konjugation mit Glutaraldehyd. Aus [23].

Bei der Verwendung von *Crosslinkern*, wie sie hier beschrieben wurden, ist keine gerichtete Konjugation möglich. Daher wurden in den letzten Jahren vermehrt peptidische Grundgerüste zur gezielten Konjugation von Peptidbindern etabliert.

### Gerichtete Oligomerisierung von Proteinen und Peptiden

Ein Beispiel für die gerichtete Oligomerisierung ist die Konjugation von Peptiden und Proteinen an ein zyklisches Dekapeptidgrundgerüst, welches von Avrutina und Kollegen beschrieben wurde [35]. Dieses zyklische Dekapeptid bietet neben der möglichen Funktionalisierung mit vier Bindemolekülen, zwei weitere Funktionalisierungsmöglichkeiten durch orthogonale Konjugation (siehe Abbildung 1.2).



**Abb. 1.2:** Schematische Darstellung des zyklischen Dekapeptidgrundgerüsts zur gerichteten Konjugation. Aus [35].

Durch dieses neuartige Grundgerüste ist es nicht nur möglich, mehrere Binder einer Art zur Verfügung zu stellen, sondern diese auch ähnlich eines funktionalisierten Antikörpers mit neuen Eigenschaften wie z.B. Fluoreszenz zu versehen. Trotz der Vorteile dieses Grundgerüsts gegenüber der einfachen chemischen Konjugation, gibt es auch Limitierungen. So wurde bisher die Konjugation von Proteinen oder pseudozyklischen Peptiden noch nicht beschrieben.

Neben der gerichteten chemischen Konjugation von Proteinen und Peptiden wurden in den letzten Jahren zunehmend rekombinante Oligomerisierungsverfahren entwickelt.

### 1.1.2. Rekombinante Oligomerisierung von Proteinen und Peptiden

Die rekombinanten Oligomerisierungsverfahren beruhen auf der Wechselwirkung mindestens zweier Proteine oder Peptide. Eine Übersicht von Beispielen aus der Literatur ist in Tabelle 1.3 dargestellt. So wurde z.B. eine Dimerisierung von Proteinen durch die Verwendung der homodimeren alkalischen Phosphatase (PhoA) aus *Escherichia coli* beschrieben [36]. Dabei werden die Konjugationspartner auf genetischer Ebene an eine Untereinheit der PhoA fusioniert. Dabei handelt es sich zumeist um Bindeproteine wie *single chain* FVs (scFV) oder camelide Antikörperdomänen. Diese Konjugationsmöglichkeit bietet, neben einer stabilen Expression, auch die Möglichkeit die Bindemoleküle zu einer direkten Funktionsanalyse zu verwenden [37]. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Homodimerisierung von Bindeproteinen unter Bildung eines bifunktionalen Moleküls hinsichtlich der Bindung und Phosphataseaktivität.

Ein weiterer Ansatz ist die Fusion der Konjugationspartner an natürlich vorkommende oder synthetische Oligomerisierungsdomänen. Weit verbreitet sind dabei sogenannte *coiled coils*. Dabei handelt es sich um natürlich vorkommende, abgeleitete oder *de novo* generierte amphiphile Peptide mit einer alpha-helikalen Sekundärstruktur. Diese Systeme ermöglichen eine Homo- und Heterodimerisierung von Konjugationspartnern. Zwei bekannte *coiled coils* sind der natürlich vorkommende Transkriptionsfaktor Jun/Fos und das *de novo* generierte Ecoli/Kcoil [38, 39].

De Kruift und Logtenberg gelang es, rekombinant hergestellte scFVs mit dem Jun/Fos-System zu dimerisieren. Dabei konnten die rekombinant hergestellten Fusionsproteine mit einer ähnlichen Ausbeute im Vergleich zu den nativen Proteinen produziert werden. Durch Reduzierung der intermolekularen Disulfidbindung und Reoxidation konnten sie aus homodimeren Fos/Fos- und Jun/Jun-Fusionen ein bispezifisches Fos/Jun-Dimer herstellen [38]. Tripet und Kollegen gelang es, ein *de novo* designtes *coiled coil* herzustellen, welches erfolgreich als Affinitäts-tag bei Proteinreinigungen verwendet werden konnte [39]. Die spezifische Bindung der hier beschriebenen *coiled coils* ermöglichte auch eine Phänotyp-Genotyp-Kopplung bei verschiedenen Oberflächen-

## 1. Einleitung und Zielsetzung

präsentationsverfahren [40-42] und die Immobilisierung von Enzymen an proteinbasierten Partikel [43].

**Tabelle 1.3:** Übersicht über gebräuchliche rekombinante Oligomerisierungsdomänen.

Oligomerisierungsdomäne	Valenzen	Anwendung	Literatur
alkalische Phosphatase	2	Homodimerisierung, Bifunktionale Moleküle	[36, 37]
Kcoil/Ecoil	2	Hetro- und Homodimerisierung, Immobilisierung von Enzymen	[39, 43]
Jun/Fos	2	Hetro- und Homodimerisierung	[38, 44, 45]
Tenascin-C	3	Homotrimerisierung	[46]
C4b Bindeprotein $\alpha$ -Domäne	7	Homoheptamerisierung, Adjuvanz	[47-49]

Die bisher beschriebenen Verfahren zur rekombinanten Oligomerisierung beschränken sich auf eine Homo- oder Heterodimerisierung von fusionierten Peptiden und Proteinen. Ein Schritt weiter geht die Verwendung von natürlichen Oligomerisierungsdomänen mit einer erweiterten Anzahl an Valenzen. Dazu gehört eine Untereinheit des Tenascin (Tenascin-C, 3 Valenzen) und die C-terminale  $\alpha$ -Domäne des C4b Bindeproteins (7 Valenzen). Berg und Kollegen haben ein Verfahren zur Trimerisierung von Liganden der TNF-Familie beschrieben. Dabei gelang es, aktive Varianten der murinen CD95 und TRAIL Liganden durch Fusion an das Tenascin-C herzustellen. Dies war bei der alternativen Verwendung von *Crosslinkern* bisher nicht gelungen [46, 50]. Ursula Dietrich und Kollegen konnten durch Heptamerisierung über die C-terminale  $\alpha$ -Domäne des C4b Bindeproteins die Serumstabilität eines Inhibitors der HIV-1 Infektion erhöhen. Da die Heptamerisierung über zwei Disulfidbrückenbindungen vermittelt wird, konnte durch Deletion eines Cysteins ein Dimer und durch die Deletion beider Cysteine ein Monomer gebildet werden. Ein Vergleich von Monomer, Dimer und Heptamer zeigte, dass die Serumstabilität bei der heptameren Variante deutlich erhöht ist [47]. Die  $\alpha$ -Domäne des C4b Bindeproteins wurde ebenfalls als Adjuvanz zur Immunisierung von Mäusen gegen Malaria verwendet. Dabei zeigte sich eine sehr hohe immunogene Wirkung, sowohl gegen das verwendete murine C4b Bindeproteine, als auch gegen das fusionierte Protein. Ogun und Kollegen konnten durch die Verwendung der Oligomerisierungsdomäne des humanen C4b Bindeproteins einer Immunantwort



entgegengewirkt und dabei den Titer von Antikörpern gegen das fusionierte Proteine erhöhen [48].

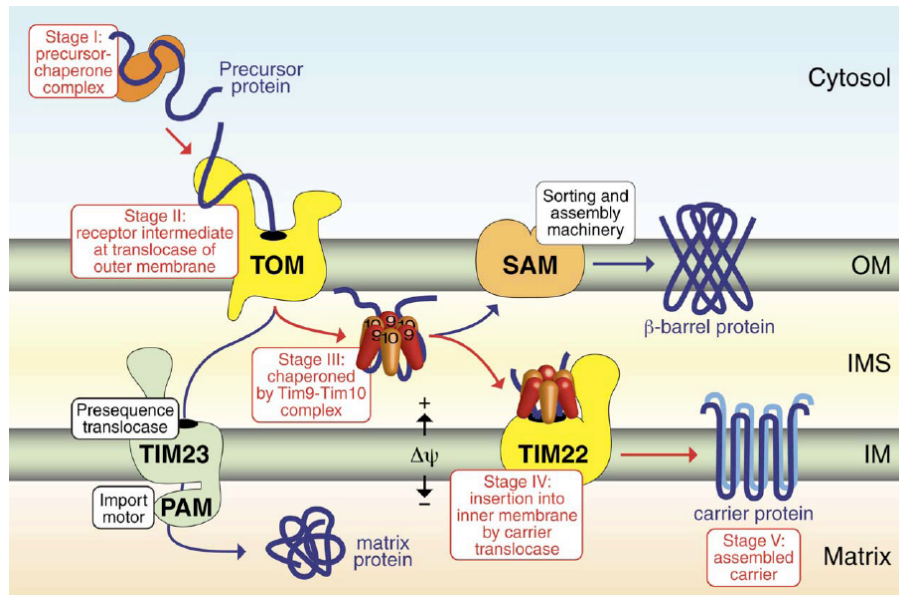
Sowohl die chemischen Verfahren zur Konjugation als auch die Verwendung von rekombinanten Oligomerisierungsdomänen zeigen somit Vor- und Nachteile. So ist bei den rekombinanten Verfahren eine weitere chemische Modifizierung z.B. zur Herstellung bifunktionaler Moleküle nicht immer gegeben oder überhaupt angedacht. Zudem beschränkt sich die Generierung bispezifischer Varianten meist auf jeweils nur eine Valenz. Eine Erhöhung der Bindeaffinität durch das Anbieten mehrere Valenzen ist daher meist nicht möglich. Bei den chemischen Konjugationsverfahren ist eine gerichtete Oligomerisierung meist nur mit zusätzlichem Aufwand zu erreichen. So ist eine ortspezifische Konjugation rekombinant eingesetzter Proteine häufig durch das mehrfache Auftreten von Aminosäuren, die für entsprechende Konjugation in Frage kommen (Lysin und Cystein) erschwert. Beiden Verfahren gemein ist der feste Abstand zwischen den Konjugationspartnern. Eine Abstandsänderung der einzelnen Valenzen zueinander ist nur durch Verwendung anderer Oligomerisierungsverfahren zu ermöglichen. Ein neues Verfahren zur Oligomerisierung sollte daher die einfache Synthese der rekombinanten Oligomerisierung mit der Flexibilität der chemischen Konjugation vereinen. Die Struktur der Oligomerisierungsdomäne sollte flexibel genug sein, um sowohl bispezifische Moleküle herstellen zu können, als auch Einfluß auf den Abstand der Valenzen zueinander nehmen zu können. Ein Protein, welches diese Randbedingungen erfüllt, ist der Tim10/Tim9-Komplex der mitochondrialen Importmaschinerie.

### **1.2. Der mitochondriale Tim10/Tim9-Komplex**

#### **1.2.1. Der mitochondriale Import von Proteinen**

Der Hauptteil der ca. 1000 mitochondrialen Proteinen werden als *Precursor*-Proteine im Cytosol synthetisiert und von dort aus über verschiedene Wege zu den jeweiligen Bestimmungsorten im Mitochondrium transportiert [51, 52]. Dabei wird zwischen Proteinen mit einer abspaltbaren Signalsequenz und Proteinen ohne abspaltbare Signalsequenz unterschieden. Ein Schema des mitochondrialen Proteinimports ist in Abbildung 1.3 dargestellt [53]. Proteine mit einer

abspaltbaren Signalsequenz werden als lineare Peptidketten über den TOM-Komplex (*translocase of the outer membrane*) in den Intermembranraum importiert. Der Import in die Matrix erfolgt über den TIM23-Komplex (*presequence translocase of the inner membrane*) und den Präsequenz-assoziierten Motor (PAM).



**Abb. 1.3:** Schema des mitochondrialen Proteinimports. OM: Äußere Membran, IMS: Intermembranraum, IM: innere Membran. Aus [52].

Die Hälfte aller mitochondrialen Proteine wird ohne abspaltbare Präsequenz synthetisiert. Dabei handelt es sich meistens um Proteine der äußeren und inneren Membran sowie des Intermembranraums. Ein möglicher Mechanismus des Imports von Carrier-Proteine wurde von Rehling und Kollegen beschrieben [52]. Er teilt sich in fünf Stufen auf (Abb. 1.3). In der ersten Stufe (*Stage I*) wird das hydrophobe *Carrier*-Protein als Peptidkette gebunden an ein cytosolisches Chaperon zum TOM-Komplex transportiert. Dort wird das *Precursor*-Protein an der Oberfläche des Mitochondriums durch den TOM-Komplex erkannt, der einen Kanal durch die äußere Membran bildet (*Stage II*). Durch diesen Kanal gelangt das *Precursor*-Protein in den Intermembranraum, wo es mit dem Tim10/Tim9-Komplex interagiert (*Stage III*). Die beiden Untereinheiten Tim9 und Tim10 bilden zusammen ein Hexamer mit einer Chaperon-ähnlichen Funktion. Sie schützen das hydrophobe *Precursor*-Protein vor weiterer Aggregation und leiten es durch den Intermembranraum zum TIM22-Komplex [51, 54-56]. Über diese zweiporige *Carrier*-Translokase der inneren Membran erfolgt die Insertion des *Carrier*-Proteins in die innere Membran (*Stage IV*) und die Freigabe des *Carrier*-Proteins in

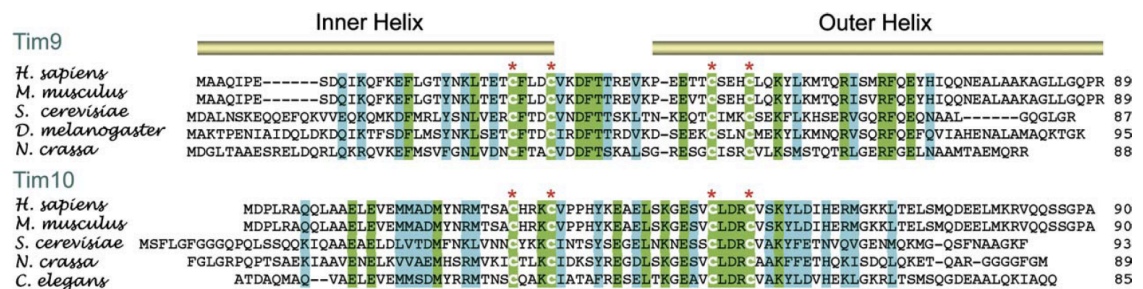
## 1. Einleitung und Zielsetzung

die Lipiddoppelschicht, wo es sich zu Homodimeren zusammenlagert (*Stage V*). Im folgenden Abschnitt soll die Struktur des mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplexes in Hinblick auf eine mögliche Verwendung als rekombinante Oligomerisierungsdomäne analysiert werden.

### 1.2.2. Die Struktur des mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplexes

Für eine mögliche Verwendung als neue rekombinante Oligomerisierungsdomäne und zur Abgrenzung von bereits etablierten Verfahren muss die Struktur des mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplexes verschiedene Kriterien erfüllen. 1. Die Struktur muß sowohl eine N- als auch eine C-terminale Funktionalisierung unter Einhaltung der nativen Konformation gewährleisten, 2. die hexamere Struktur sollte gegenüber äußeren Einflüssen stabil sein und 3. eine Oligomerisierung sollte ohne weitere Modifikation oder chemische Konjugation möglich sein.

Die Untereinheiten des Tim10/Tim9-Komplexes, Tim9 und Tim10, sind Mitglieder der „kleinen Tim“-Familie, ca. 10 kDa großer Polypeptide. Die Familie umfasst unter anderem Tim8, 9, 10, 12 und 13. Die Familie der kleinen Tims weisen ein konserviertes  $CX_3CX_nCX_3C$  ( $n \approx 15$ , *twin*- $CX_3C$ -Motiv) Sequenzmotiv auf (siehe Abbildung 1.4) [57].

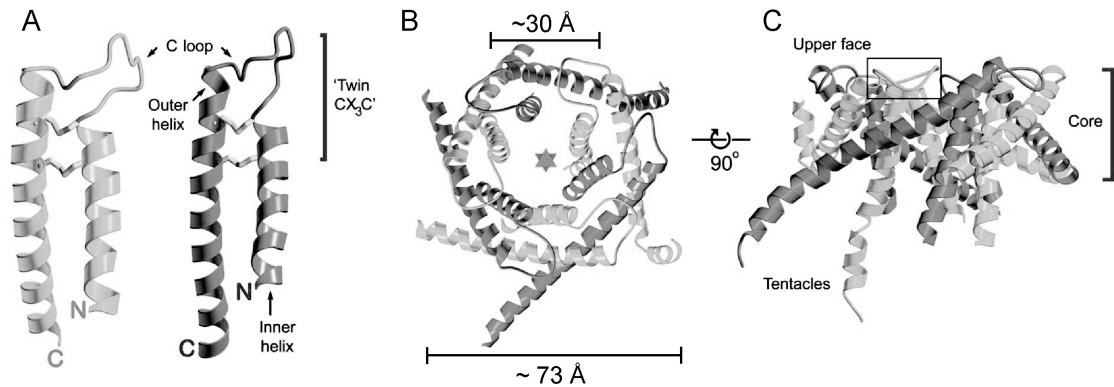


**Abb. 1.4:** Phylogenetisches Alignment der Tim10- und Tim9-Untereinheiten verschiedener Organismen. Konservierte Cysteine sind mit einem roten Stern gekennzeichnet. Identische Aminosäuren sind grün hinterlegt, hoch konservierte Bereiche sind blau hinterlegt. Aus [57]

Jede der beiden Untereinheiten besteht aus zwei über einen *loop* verbundenen  $\alpha$ -Helices, welche durch zwei Disulfidbrückenbindungen miteinander verbunden sind (Abbildung 1.5 A). Durch die Hexamerisierung entsteht somit ein zentraler *loop* (*C loop*), der auch die Kernstruktur des Komplexes darstellt (Abb. 1.5 B + C). Die Struktur wird als ein  $\alpha$ -Propeller beschrieben. Das Hexamer bildet eine *Donut*-ähnliche Oberfläche mit zu einer Seite herausgestreckten Tentakeln. Die kürzeren N-terminalen Helices bilden einen Pore von 15 Å Durchmesser und einer Höhe von

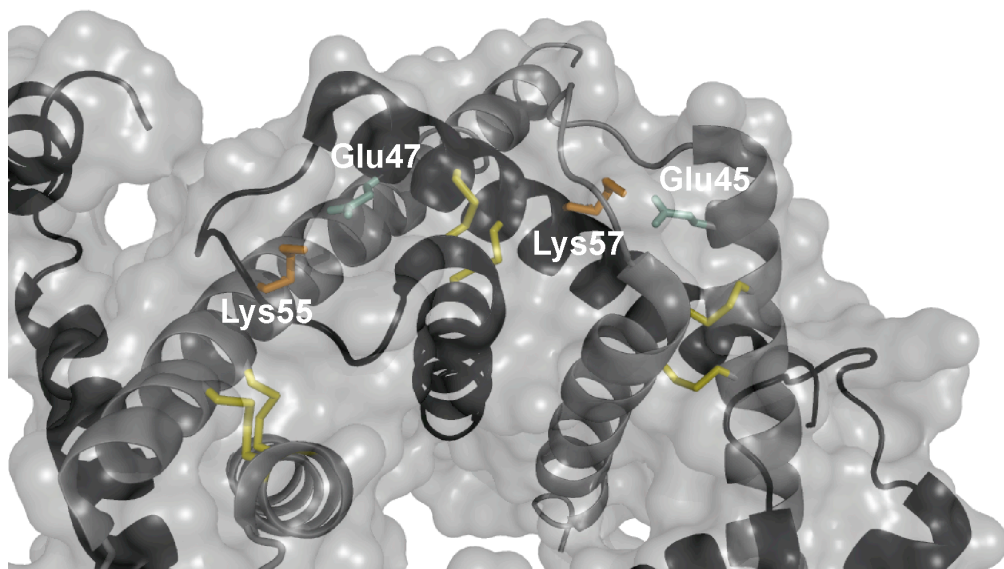
## 1. Einleitung und Zielsetzung

ca. 35 Å. Die Kernstruktur hat einen Durchmesser von ca. 50-60 Å. Nur die Aminosäuren bis zum His71 bei der Tim9-Untereinheit und bis zum Leu72 bei der Tim10-Untereinheit sind für die intramolekulare Stabilität des Komplexes wichtig. Alle Aminosäuren, welche C-terminal von His71 bzw. Leu72 liegen, haben keine strukturstabilisierende Funktion.



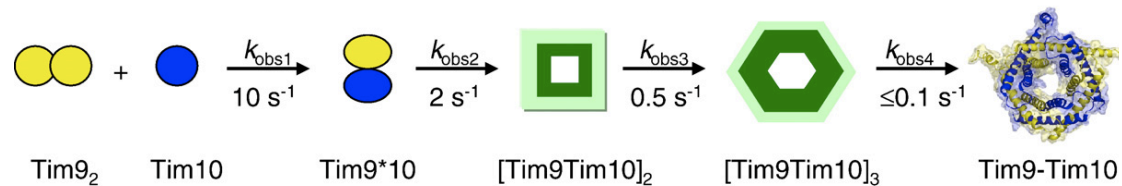
**Abb. 1.5:** Struktur des Tim10/Tim9-Komplexes. **A:** Tim10- (dunkelgrau) und Tim9-Untereinheit (hellgrau), **B:** Blick auf die loops, Der Abstand zwischen den N-terminalen Enden der Helices beträgt ca. 30 Å. Der Abstand zwischen den C-terminalen Enden der Helices beträgt ca. 73 Å. **C:** Seitliche Sicht. Modifiziert nach [57].

Die Verknüpfung der einzelnen Monomere zum Hexamer wird über Salzbrücken vermittelt. Dabei interagieren jeweils das Tim9-Lys55 mit dem Tim10-Glu47 und das Tim10-Lys57 mit dem Tim9-Glu45 (Abb. 1.6).



**Abb. 1.6:** Intramolekulare Wechselwirkungen zwischen der Tim9- (grau) und der Tim10-Untereinheit (schwarz). Lysine sind in orange hervorgehoben, Glutamine sind in grün hervorgehoben. Disulfidbrückenbindungen sind gelb dargestellt.

Die Stabilität der hexameren Struktur beruht auf der hohen submikromolaren Affinität ( $K_d$ : 0,2  $\mu$ M) der beiden Untereinheiten zueinander [58]. Die Disulfidbrückenbindungen sind durch die hexamere Struktur vor Reduktion geschützt. Für die Assemblierung eines funktionalen Tim10-Komplexes haben Ivanova und Kollegen ein Modell postuliert, welches eine Autoassemblierung über mehrere Intermediate annimmt (Abbildung 1.7) [59].



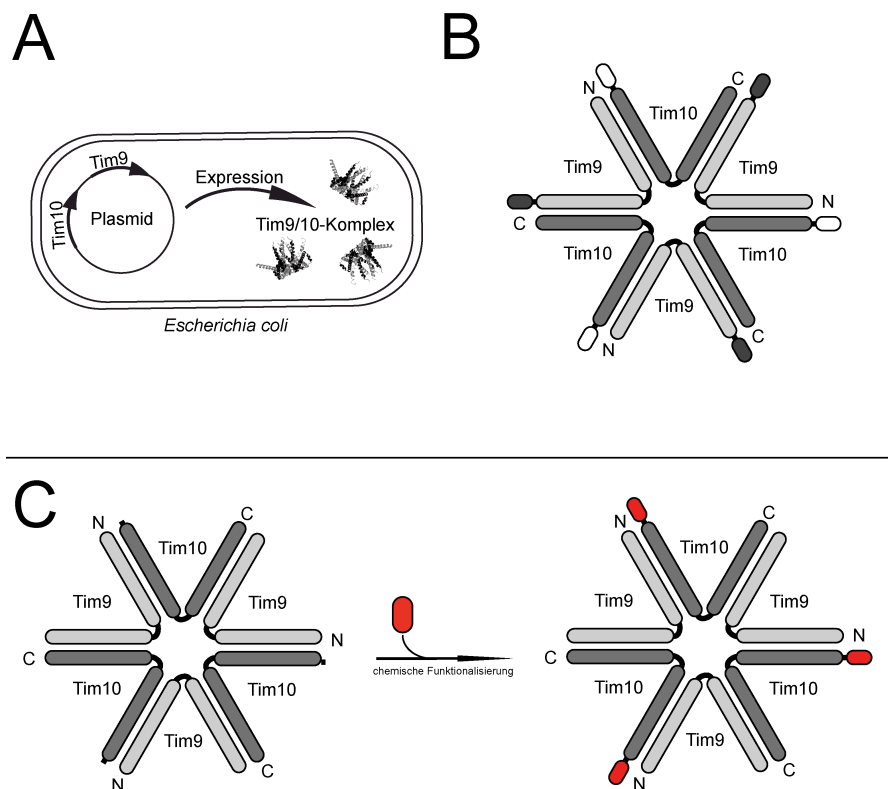
**Abb:1.7:** Schema der Assemblierung eines funktionalen hexameren Tim10/Tim9-Komplexes. Aus [59].

Die Autoren vermuten, dass die Assemblierung in vier Schritten aufgeteilt werden kann. Zunächst bildet sich unter Dissoziation eines Tim9-Dimers ein Tim9-Tim10-Heterodimer. Dem folgt eine Aneinanderlagerung zweier Heterodimere zu einem Tetramer. Durch Aufnahme eines weiteren Dimers bildet sich über ein ungeordnetes Intermediat das funktionelle Hexamer. Die Assemblierung zum Hexamer ist dabei kinetisch von Vorteil. Daher findet sie ohne weitere Zufuhr von Energie statt. Diese Selbstassemblierung wird auch durch Funktionsanalysen rekombinant hergestellter Tim9- und Tim10-Untereinheiten bestätigt [58].

Die Strukturanalyse zeigt, dass eine rekombinante Oligomerisierung über den mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplex möglich sein sollte. Die Struktur erlaubt durch die Selbstassemblierung des Hexamers eine einfache Oligomerisierung. Die konservierten Sequenzen zur Ausbildung der hexameren Struktur erlauben sowohl eine C- als auch eine N-terminale Funktionalisierung. Zudem weist der funktionale Tim10/Tim9-Komplex eine hohe Stabilität auf, welche auf die Affinität der Untereinheiten zueinander zurückzuführen ist. Der nächste Abschnitt beschreibt ein mögliches Modell zur rekombinanten Oligomerisierung über den mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplex.

### 1.3. Oligomerisierung von Passagierdomänen über den mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplex

Ein neues System zur rekombinanten Oligomerisierung muß zur Abgrenzung gegenüber alternativen etablierten Verfahren verschiedenen Ansprüchen genügen. So muß nicht nur eine einfache rekombinante Synthese gewährleistet sein, sondern auch die Möglichkeit, bispezifische Konjugate herzustellen, welche flexibel in der Anordnung und im Abstand der Valenzen zueinander sind. Zudem sollte eine spezifische gerichtete chemische Funktionalisierung ermöglicht werden. Die außergewöhnliche Struktur des Tim10/Tim9-Komplexes bietet dafür viele Möglichkeiten (Abbildung 1.8).



**Abb. 1.8:** Modell der rekombinanten Oligomerisierung über den mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplex. Dunkelgrau: Tim10-Untereinheit, hellgrau: Tim9-Untereinheit, N: N-Terminus, C: C-Terminus. **A:** Expression und Selbstassemblierung der Untereinheiten in *Escherichia coli*. **B:** Schematische Darstellung der Untereinheiten. Weiß: N-terminale Fusion. Schwarz: C-terminale Fusion. **C:** chemische Funktionalisierung am N-Terminus der Tim10-Untereinheit durch gerichtete Oxidation eines Serinrestes.

Aufgrund der Selbstassemblierungseigenschaften wäre eine Oligomerisierung funktionalisierter Untereinheiten schon bei der Expression in *Escherichia coli* in einem Schritt möglich (Abbildung 1.8 A). Wenn der mitochondriale Tim10/Tim9-Komplex eine N- und eine C-terminale Fusion der zu konjugierenden Proteine und

Peptide ermöglichen würde, könnte der Abstand zu den Konjugationspartnern variiert werden. Bei einer N-terminalen Fusion würde der Abstand ca. 30 Å betragen. Dieser könnte durch Fusion an den C-Terminus auf ca. 73 Å erweitert werden (Abbildung 1.5 B und 1.8 B). Zudem kann durch die Belegung beider Untereinheiten eine bispezifische Variante hergestellt werden. Wünschenswert wäre, zusätzlich zur rekombinanten Herstellung von Fusionsproteinen mit dem Tim10/Tim9-Komplex, die Möglichkeit einer chemischen Konjugation, die eine selektive Anknüpfung eines Passagierproteins an den N- oder C-Terminus ermöglicht. Die Entwicklung eines solchen Verfahrens war neben der rekombinanten Herstellung ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit (Abbildung 1.8 C).

### 1.4. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist der Aufbau und die Etablierung eines Verfahrens zur Herstellung von homo- und heterooligomeren Proteinkomplexen auf der strukturellen Grundlage des mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplexes. Außerdem soll die Möglichkeit zur chemischen Funktionalisierung der Oligomerisierungsdomäne experimentell ausgelotet werden. Um eine Alternative zu bereits etablierten Konjugations- und Oligomerisierungsmethoden darzustellen, soll die Oligomerisierungsdomäne auf folgende Eigenschaften hin untersucht werden:

- I. Ist eine einfache rekombinante Synthese funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe unter Einhaltung der hexameren Struktur möglich?
- II. Ermöglicht das System die Generierung bispezifischer Konjugate?
- III. Ist die Oligomerisierung hinsichtlich ihrer Faltung komplexen Proteinen möglich?
- IV. Ist eine Bindung an oder die Modulation eines pharmazeutisch relevanten Rezeptors möglich?
- V. Ist eine spezifische chemische Funktionalisierung des Tim10/Tim9-Komplexes unter Einhaltung der hexameren Struktur möglich?



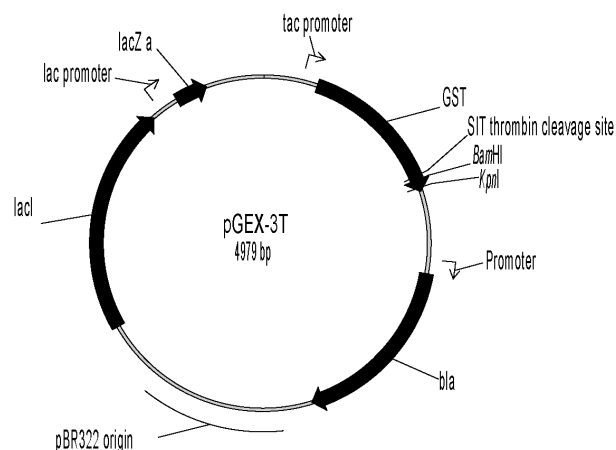
## 2. Materialien

### 2.1. Organismen und Plasmide

#### 2.1.1. Organismen

Stamm	Genotyp	Referenz/Herkunft
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
Top 10	<i>F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1 λ<sup>-</sup></i>	[60]
Origami (DE3) pLysS	<i>Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL[F'(lac<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> pro)] (DE3)gor522::Tn10 trxB (Kan<sup>R</sup>, Str<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>), pLysS</i>	Merck KGaA, Darmstadt
BL21 (DE3)	<i>F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	[61]
SHuffle T7	<i>huA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT ahpC gal λatt::pNEB3-r1-cDsbC (Spec<sup>R</sup>, lacI<sup>q</sup>) ΔtrxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet<sup>S</sup>)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10 --Tet<sup>S</sup>) endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i>	NEB Inc., Ipswich, U.S.A
<b>humane Zelllinien</b>		
M-07e	-	[62]/Aus dem peripheren Blut eines 6 Monate alten Kindes mit akuter megakaryoblastischer Leukämie.

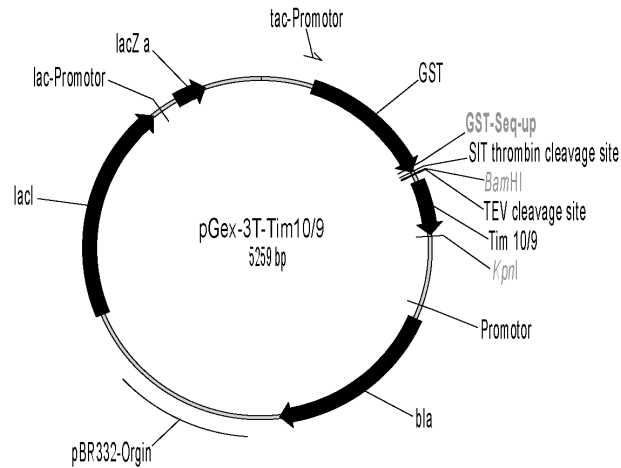
#### 2.1.2. Plasmide



#### Genetische Karte des Plasmids pGEX-3T.

Die funktionelle Orientierung der genetischen Elemente ist durch die Pfeilrichtung angegeben. lac promoter: lac Promotorsequenz, tac promoter: tac Promotorsequenz, GST: Glutathion-S-Transferase, SIT thrombin cleavage site: Erkennungssequenz für die Protease Thrombin, BamHI und KpnI: Restriktionsschnittstellen für die Enzyme BamHI und KpnI, bla: β-Laktamase-Gen, pBR322 origin: Replikationsursprung, lacI: lac-Repressor, lacZ a: β-Galaktosidase Gen.

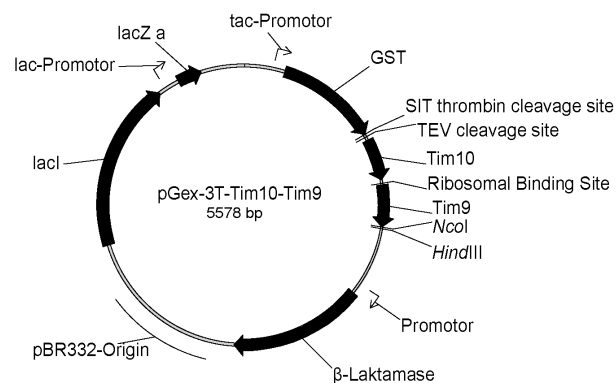




**Genetische Karte für die Plasmide pGex-3T-Tim10 und pGex-3T-Tim9.** Die funktionelle Orientierung der genetischen Elemente ist durch die Pfeilrichtung angegeben. lac-Promotor: lac Promotorsequenz, tac-Promotor: tac Promotorsequenz, GST: Glutathion-S-Transferase, SIT thrombin cleavage site: Erkennungssequenz für die Protease Thrombin, BamHI und KpnI: Restriktionsschnittstellen für die Enzyme BamHI und KpnI, bla: β-Laktamase-Gen, pBR322-Origin: Replikationsursprung, lacI: lac-Repressor, lacZ a: β-Galaktosidase Gen, Tim10/9: Tim10 oder Tim9-Gen.

### Varianten

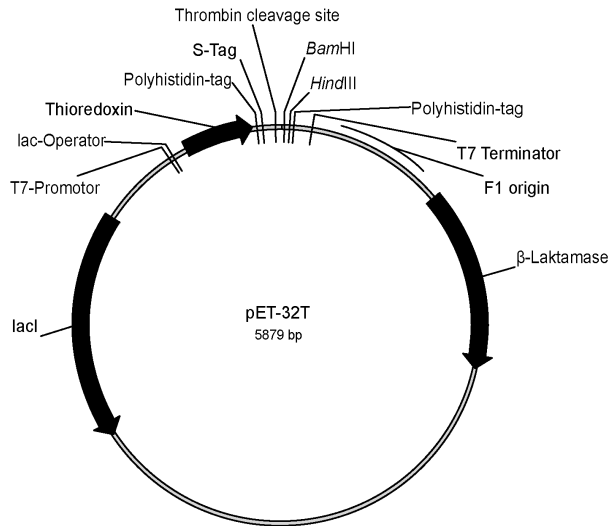
pGex-3T-Tim10N  
pGex-3T-Tim10C  
pGex-3T-Tim9cMyc  
pGex-3T-Tim9-ET-TP-020  
pGex-3T-Tim9-AG-HE-050



**Genetische Karte des Plasmids pGex-3T-Tim10 Tim9.** Die funktionelle Orientierung der genetischen Elemente ist durch die Pfeilrichtung angegeben. lac-Promotor: lac Promotorsequenz, tac-Promotor: tac Promotorsequenz, GST: Glutathion-S-Transferase, SIT thrombin cleavage site: Erkennungssequenz für die Protease Thrombin, TEV cleavage site: Erkennungssequenz für die TEV-Protease, NcoI und HindIII: Restriktionsschnittstellen für die Enzyme NcoI und HindIII, β-Laktamase: β-Laktamase-Gen, pBR322-Origin: Replikationsursprung, lacI: lac-Repressor, lacZ a: β-Galaktosidase Gen, Tim10: Tim10 Gen, Ribosomal Binding Site: Ribosomale Bindestelle, Tim9: Tim9-Gen.

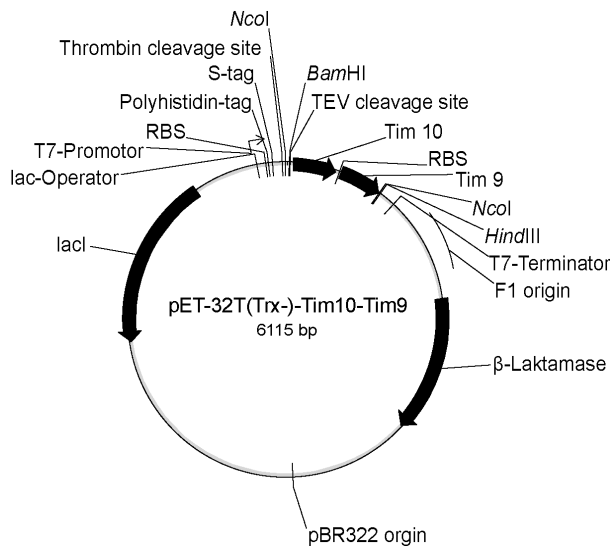
### Varianten

pGex-3T-Tim10 Tim9cMyc  
pGex-3T-Tim10 Tim9-ET-TP-020  
pGex-3T-Tim10 Tim9-TP-020



### Genetische Karte des Plasmids pET-32T.

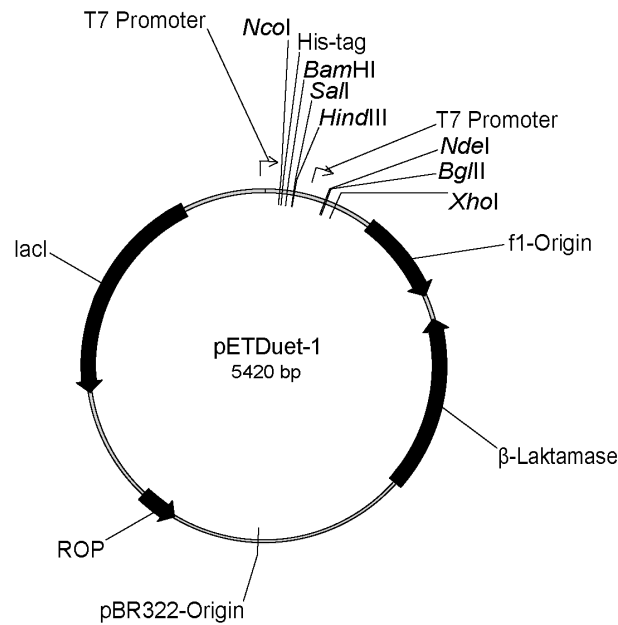
Die funktionelle Orientierung der genetischen Elemente ist durch die Pfeilrichtung angegeben. T7-Promotor: T7-Promotorsequenz, lac-Operator: lac-Operatorsequenz, Thioredoxin: Thioredoxin-Gen, Polyhistidin-tag: Gen für 6 Histidine, S-Tag: Gen für das S-tag Peptid, Thrombin cleavage site: Erkennungssequenz für die Protease Thrombin, BamHI und HindIII: Restriktionsschnittstellen für die Enzyme BamHI und HindIII, β-Laktamase: β-Laktamase-Gen, F1 origin: Replikationsursprung des Phagen f1, lacI: lac-Repressor; T7 Terminator: T7-Terminationssequenz.



### Genetische Karte des Plasmids pET-32T(Trx-)-Tim10 Tim9.

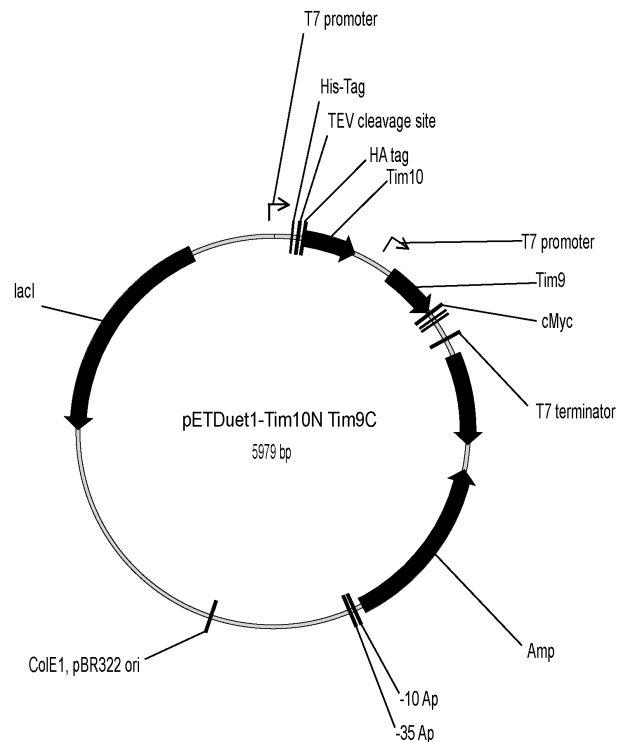
Die funktionelle Orientierung der genetischen Elemente ist durch die Pfeilrichtung angegeben. T7-Promotor: T7-Promotorsequenz, lac-Operator: lac-Operatorsequenz, RBS: Ribosomale Bindestelle, Polyhistidin-tag: Gen für 6 Histidine, S-Tag: Gen für das S-tag Peptid, Thrombin cleavage site: Erkennungssequenz für die Protease Thrombin, NcoI, BamHI und HindIII: Restriktionsschnittstellen für die Enzyme NcoI, BamHI und HindIII, TEV cleavage site: Erkennungssequenz für die TEV-Protease, β-Laktamase: β-Laktamase-Gen, F1 origin: Replikationsursprung, lacI: lac-Repressor, T7 Terminator: T7-Terminationssequenz, Tim10: Tim10 Gen, Tim9: Tim9-Gen, pBR322 origin: Replikationsursprung.

**Varianten** pET-32T(Trx-)-Tim10 Tim9cMyc



### Genetische Karte des Plasmids pETDuet-

**1.** Die funktionelle Orientierung der genetischen Elemente ist durch die Pfeilrichtung angegeben. T7-Promotor: T7-Promotorsequenz, His-tag: Gen für 6 Histidine, NcoI, BamHI, SalI, NdeI, BglII, XhoI und HindIII: Restriktionsschnittstellen für die Enzyme NcoI, BamHI, SalI, NdeI, BglII, XhoI und HindIII, β-Laktamase: β-Laktamase-Gen, f1-Origin: Replikationsursprung des Phagen f1, lacI: lac-Repressor, pBR322-Origin: Replikationsursprung, ROP: repressor of primer.

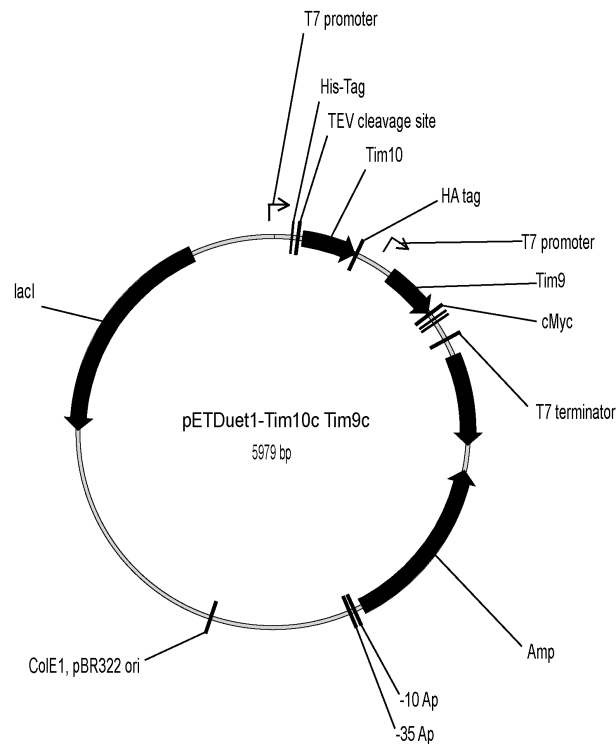


### Genetische Karte des Plasmids pETDuet-

**1-Tim10N Tim9C.** Die funktionelle Orientierung der genetischen Elemente ist durch die Pfeilrichtung angegeben. T7 promoter: T7-Promotorsequenz, TEV cleavage site: Erkennungssequenz für die TEV-Protease, His-tag: Gen für 6 Histidine, Amp: β-Laktamase-Gen, lacI: lac-Repressor, Tim10: Tim10 Gen, Tim9: Tim9-Gen, cMyc: cMyc-Epitop Gensequenz, HA tag: HA-Epitop Gensequenz, T7 terminator: T7-Terminationssequenz, ColE1, pBR322-Origin: Replikationsursprung, ROP: repressor of primer.

### Varianten

pETDuet-1-Tim10N-AHNP Tim9C  
pETDuet-1-Tim10N-AHNP Tim9C-P-4  
pETDuet-1-Tim10N Tim9C-P-4  
pETDuet-1-Tim10N-ET-TP-020 Tim9C  
pETDuet-1-Tim10N Tim9C-ET-TP-020



**Genetische Karte des Plasmids pETDuet-1-Tim10c Tim9c.** Die funktionelle Orientierung der genetischen Elemente ist durch die Pfeilrichtung angegeben. T7 promotor: T7-Promotorsequenz, TEV cleavage site: Erkennungssequenz für die TEV-Protease, His-tag: Gen für 6 Histidine, Amp:  $\beta$ -Laktamase-Gen, lacI: lac-Repressor, Tim10: Tim10 Gen, Tim9: Tim9-Gen, cMyc: cMyc-Epitop Gensequenz, HA tag: HA-Epitop Gensequenz, T7 terminator: T7-Terminationssequenz, ColE1, pBR322-Origin: Replikationsursprung, ROP: *repressor of primer*.

**Varianten** pETDuet-1-Tim10C-P-3 Tim9C  
pETDuet-1-Tim10C Tim9C-P-4  
pETDuet-1-Tim10C-P-3 Tim9C-P-4

### 2.2. Oligonukleotide

ET-TP-020_BglII_up	5'-GCGCGCAGATCTATGGGGTGCATCGAAGGTCCG
ET-TP-020_XhoI_lo	5'-GCGCGCCTCGAGGGATCCGCAGAAACCGTTGGG
GST-Seq-up	5'-GGCGACCATCCTCCAAAATCG
T7-Terminator_pET1	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG
T7prom-Bsu15I-up	5'-ATCGAGATCGATCTCGATCCC GCG
Tim10_BglII_TEV_linker_HA_up1	5'-GCGCGCAGATCTAGAAAACCTGTATTTTCAGTCGGGATCCTATC CGTATGATGTGCCGATT
Tim10_BglII_TEV_linker_HA_up2	5'-CGTATGATGTGCCGATTATGCGGTCGACATGGACCCTCTCAGG GCCCCA
Tim10_BglII_TEV_up	5'-GCGCGCAGATCTAGAAAACCTGTATTTTCAGTCGATGGACCCTC TCAGGGCC
Tim10_ClaI_HindIII_lo	5'-GCGCGCAAGCTTATCGATTATGCAGGCCAGAGCTCTG
Tim10_KpnI_lo	5'-GCGCGCGGTACCTTATGCAGGCCAGAGCTCTGCTGCACCCT
Tim10_linker_TEV_up_neu	5'-GCGCGCGGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGTCGGTCGACAAGCT TTCCATGGACCCTCTCAGGGCCCAACAGCTG

## 2. Materialien

---

Tim10_linker_HA_lo	5'-GCGCGCAAGCTTAGTCGACCGCATAATCCGGCACATCATACGGA TAGGATCCTGCAGGCCAGAGCTCTG
Tim10_NcoI_HindIII_lo	5'-GCGCGCAAGCTTACCCCATGGATGCAGGCCAGAGCTCTGCTGC ACCTT
Tim10_P3_lo1	5'-GTCTTCGCACCAGGTCGGACCCGCGGATCCTGCAGGCCAGAGC TCTG
Tim10_P3_lo2	5'-GCGCGCGTCGACGGTACCGAACAGCCAGCAGTAGTACCAGTCGT CTTCGCACCAGGTCGG
Tim10_TEV_BamHI_up	5'-GCGCGCGGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGTCGATGGACCCTC
Tim9_BamHI_TEV_up	5'-GCGCGCGGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGTCGATGGCTGCACA AATACCAGAATCTGAT
Tim9_cMyc_Hind_lo	5'-GCGCGCAAGCTTATCGATTTACAGATTCTCTCTGAGATGAGTT TTTGTTCCATGGATCGTGGTTGGCCAAGGAG
Tim9_linker_Myc_lo	5'-GCGCGCGTCGACTTACTCGAGCAGATCCTCTCTGAGATGAGTT TTTGTTTCAGATCTTCGTGGTTGGCCAAGGAG
Tim9_NcoI_HindIII_lo	5'-GCGCGCAAGCTTACCCCATGGATCGTGGTTGGCCAAGGAGTCCT GCTTT
Tim9_NcoI_HindIII_lo	5'-GCGCGCAAGCTTACCCCATGGATCGTGGTTGGCCAAGGAGTCCT GCTTT
Tim9_NdeI_Duet_up	5'-GCGCGCCATATGGCTGCACAAATACCAGAA
Tim9_P4_lo1	5'-CCAAGAGTCTTCCCAGCAAACAGATCTTCGTGGTTGGCCAAGGA G
Tim9_P4_lo2	5'-GCGCGCCTCGAGCGGGTCGTAACGGAAGCAAACCTTCACCACCCC AAGAGTCTTCCCAGCA
Tim9_shine_dalgarno_PagI_up	5'-GCGCGCTCATGAGCTAATAAACCGGTGGACAAAATAAATGGCT GCACAAATACCAGAATCTGAT
Tim9_TP020_Hind_lo_neu	5'-GCGCGCAAGCTTATCGATTTAAGCACGAGCAGCCAGCCACTGAC GCAGGGTCGGACCTTCGATCCCCATGGATCGTGGTTGGCCAAGGAG

### 2.3. DNA- und Proteinlängenstandards

Alle verwendeten Protein- und DNA-Längenstandards wurden von Fermentas *Life Sciences* (Burlington, Kanada) bezogen.

<i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i>	relative Molekulargewichte: 14400, 18400, 25000, 35000, 45000, 66200, 116000.
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>	relative Molekulargewichte: ~10000, ~15000, ~25000, ~35000, ~40000, ~50000, ~70000, ~100000, ~130000, ~170000.
<i>λ DNA/Eco47I (AvaII) Marker, 13</i>	Fragmentlängen in bp: 8126, 6555, 6442, 3676, 2605, 2555, 2134, 2005, 1951, 1612, 1420, 1284, 985, 974, 894, 597, 590, 513, 511, 433, 345, 398, 310, 308, 272, 242, 215, 151, 88, 72, 67, 45, 42, 32, 28, 23.

## 2. Materialien

---

### 2.4. Puffer und Lösungen

Alkalische Phosphatase Reaktions-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 9,0 100 mM NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
Ammoniumacetat-Stammlösung zur DNA - Fällung	7 M Ammoniumacetat in Wasser
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/mL Ampicillin (Na-Salz) in Wasser, sterilfiltriert
Anodenpuffer (BN-PAGE)	50 mM Bis-Tris, pH 7
Anodenpuffer (SDS-PAGE)	0,2 M Tris-HCl pH 8.9
APS-Stammlösung	10 % (v/v) APS in Wasser
BCIP-Lösung	50 mg/mL BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat-p-Toluidinsalz) in 70 % (v/v) Dimethylformamid
Blocking-Puffer	3 % (w/v) Milchpulver in PBS-Puffer
Chloramphenicol - Stammlösung	25 mg/mL Chloramphenicol in 96 % (v/v) Ethanol
Coomassie-Färbelösung für SDS-PAGE	Coomassie R-250 0.7 % (w/v) in Methanol  Essigsäure 20 % (w/v)  Vor Gebrauch werden beide Lösungen zu gleichen Teilen gemischt
dNTPs	Je 10 mM dNTP (N = A, C, G, T) in Wasser
Ethidiumbromid-Stammlösung (10x)	10 mg/mL Ethidiumbromid
Hoechst-Puffer	8 M Harnstoff 200 mM Tris-Base 200 mM DTT 2 % (w/v) SDS 0,15 mM Bromphenolblau
IMAC-A Puffer	100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8.0 (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) NaCl 100 mM
IMAC-B Puffer	100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8.0 (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ), NaCl 100 mM Imidazol 1 M
IPTG-Stammlösung	1 M IPTG in Wasser, sterilfiltriert
Kanamycin-Stammlösung	75 mg/mL Kanamycin in Wasser, sterilfiltriert
Kathodenpuffer (BN-PAGE)	50 mM Tricine 15 mM Bis-Tris pH 7 0,02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G

## 2. Materialien

---

Kathodenpuffer (SDS-PAGE)	Tris-Base 0,1 M Tricine 0,1 M SDS 0,1 % (w/v)
NBT-Stammlösung	75 mg/mL NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) in 70 % (v/v) Dimethylformamid
PBS-Puffer	140 mM NaCl 10 mM KCl 6,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS Tween-Puffer	140 mM NaCl 10 mM KCl 6,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05 % (v/v) Tween 20
Reaktionspuffer für Restriktionsendonukleasen	nach Herstellerangaben, Fermentas <i>Life Sciences</i> (Burlington, Kanada)
Sucrosefarbmarker	60 % (w/v) Sucrose 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 0,1 % (w/v) Xylencyanol FF in 1x TAE
T4-DNA-Ligase-Puffer	nach Herstellerangaben, Fermentas <i>Life Sciences</i> (Burlington, Kanada)
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Acetat 50 mM EDTA
Taq 10x Puffer (Fermentas)	nach Herstellerangaben
Tetrazyklin-Stammlösung	10 µL/mL Tetrazyklin in 70 % (w/v) Ethanol, bei -20 °C lagern.
TEV-Protease Reaktionspuffer	500 mM Tris-HCl 1,5 M NaCl 5 mM EDTA pH 7,5
Western Blot-Transferpuffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Pufferlösungen in H<sub>2</sub>O bidest. angesetzt.

### 2.5. Kommerziell erhältliche Systeme

Promega	<i>Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System</i> <i>PureYield™ Plasmid Miniprep System</i>
GE Healthcare	<i>Gel Filtration Calibration Kit - LMW</i>

### 2.6. Kulturmedien

LB	0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt 1 % (w/v) Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut 1 % (w/v) NaCl
dYT	1 % (w/v) Hefe-Extrakt 1,6 % (w/v) Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut 0,5 % (w/v) NaCl
Agar-Platten	+ 1,5% Agar
RPMI 1640 mit L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
RFG(-GMCSF)/(-rhTPO)	RPMI 1640 mit L-Glutamin 10% Fetales Kälberserum 50 µg/mL Gentamycin 10U/mL GM-CSF (-GMCSF) 50 ng/mL rekombinantes humanes Thrombopoietin (-rhTPO)

### 2.7. Chemikalien, Enzyme und Antikörper

2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) Rotiphoese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Agar	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Int. Biotechnologies Inc. New Haven (USA)
Ampicillin-Dinatriumsalz	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Anti-Glutathion S-Transferase, <i>rabbit</i> IgG	Molecular Probes (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.)
Anti-cMyc-tag	Prof. Dr. P. Friedl, TU Darmstadt
Bacillol plus	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Chill-out 14 Liquid Wax	MJ Research, Cambridge, MA (USA)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloroform	AppliChem, Darmstadt
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
dNTP Set	Invitex, Berlin



## 2. Materialien

---

EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ethanol, 96 %	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Fluorescein-5-Thiosemicarbazid (Fluka)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Goat</i> , Anti-Mouse IgG ( <i>whole molecule</i> ), alkalische Phosphatase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Methanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
<i>Mouse, monoclonal</i> Anti-HA, <i>clone</i> HA-7	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N,N-Dimethylformamid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Temed)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumperodat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Restriktionsenzyme	Fermentas <i>Life Sciences</i> (Burlington, Kanada)
Salzsäure, mind. 37 %, rauchend	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
SDS ultra pure	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Fermentas <i>Life Sciences</i> (Burlington, Kanada)
Taq-DNA-Polymerase, LC	Fermentas <i>Life Sciences</i> (Burlington, Kanada)
Tetracyclin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TRIS	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	Schill + Seilacher chemische Spezialitäten, Hamburg

### 2.8. Geräte und sonstige Materialien

American National Can., Chicago, USA	Parafilm "M" Laboratory Film
BD Falcon™, San Jose, U.S.A.	Gewebekulturflaschen (50 und 750 mL)
Bender & Hobein, Zürich, Schweiz	Vortex Genie 2

## 2. Materialien

---

BioRad, München	Gene Pulser XCell und Pulse Controller, Elektroporationsküvetten
Biozym, Hessisch Oldendorf	PCR-Tube ultradünn, 0,2 mL
Brand, Wertheim	PLASTIBRAND® UV-Küvetten
C. A. Greiner & Söhne, Nürtingen	Röhrchen 15 ml, Cellstar 96well <i>F-bottom</i> Gewebekulturplatten
Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg	Mastercycler personal, Centrifuge 5415 D, Centrifuge 5415 R, Bio Photometer, Thermomixer compact
Fortebio, Menlo Park, USA	Octet red (Bio-Layer Interferometer)
GE Healthcare Europe GmbH, München	<i>Chelating Sepharose Fast Flow</i> (IMAC Säulenmaterial)
	Elektrophoresis Power Supply EPS 301 und 601;
	Äkta basic FPLC Anlage: UV900, P900, Frac 900
Gilson, USA	Mikroliter-Pipetten: Pipetman, 1000 µL, 200 µL & 20 µL
Heidolph Instruments, Kehlheim	Polymax 2040
Helma, Müllheim/Baden	Quarzküvetten (0,5 mL, 1 cm Schichtdicke)
Heraeus, Hanau	Multifuge 3L-R, Multifuge 1.0, Quarzglas-Bi-Destillationseinrichtung, Typ Destamat E 18, LaminAir HLB 2460 BS, Kelvitron ® (Inkubator), Brutschrank
Herolab, Wiesloch	UVT2035 302 nm (UV-Leuchttisch)
Hettich Andreas GmbH & Co. KG Tuttlingen	TZ Mikroliter 15 k rpm
Hoefer Scientific, San Francisco, USA	Platten für SDS-Gele, SE 250 Gelkammer,
HTC	Mikroliter-Pipetten: Discovery, 1000 µL, 200 µL & 20 µL
IKA-Labortechnik, Staufen	beheizbarer Magnetrührer IKAMAG RCT, Schüttler VIBRAX-VXR, KM02 Magnetrührer
Intas, Göttingen	Gel Jet Imager
Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.	Molecular Probes® <i>Glutathione Agarose</i>
Kimberley-Clark, USA	Kimwipes® Papiertücher
Kontron Instruments, Roßdorf	HPLC Pumpe 422 S, HPLC540+ DIODE ARRAY DETECTOR
Leitz, Wetzlar	Diaver (Mikroskop)
M.D.H. Intermed GmbH	Sterilbank

## 2. Materialien

---

Millipore, Eschborn	Filtereinheiten Millex FG13, Ultrafree-20 Nanopore-Wasser-Anlage
Moulinex, Alençon (Frankreich)	Mikrowelle Microchef FM 3510
Olaf Waase, Groß Schneen	Thermoblock V 4.0, Agarosegelkammer
Pharmacia Biotech, Freiburg	Autoklav HST 4-5-6
Phenomenex, Torrance, U.S.A.	BioSep SEC-2000
Roth, Karlsruhe	ZelluTrans, Rotiprotect Latex (Handschuhe), Serologische Pipetten, Visking® 20/32 Dialysierschlauch
SANYO E&E Europe BV, Biomedical Division, Loughborough (UK)	VIP Series -86 °C Freezer
Sarsted, Nürnberg	Safe Seal Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml, Röhrchen 50 ml, Petrischalen, Pipettenspitzen
Schleicher und Schuell, Dassel	Nitrozellulose-Membranen (0,45 µm), 3 MM-Filterpapier (Whatman)
Schott, Mainz	Glaswaren
Scotsman Ice Systems, IL (USA)	AF 100 (Eismaschine)
Shimadzu Corporation, Kyoto (Japan)	UV 1650 PC UV-Visible Spectrophotometer
Sigma Laboratory Centrifuges, Osterode am Harz	Kühlzentrifuge 3K30 mit Rotor 12158 H, Kühlzentrifuge 6K15 mit Rotor 12500, Feinwaage AX200
SLM AMINCO® SLM INSTRUMENTS, INC, Schwäbisch Gmünd	French® Pressure Cell Press
Terumo, Leuven, Belgien	UNIHOOD (Inkubator)
UniEquip, Martinsried	Syringe Spritzen, 5 ml, 10 ml, 30 ml
Zeiss Winkel, Göttingen	Mikroskop
Zirbus, Bad Grund	2117-250 Novoblot (Western Blot Transfer Apparat)

### 2.9. Datenverarbeitungsprogramme

Word	Microsoft, Redmond, U.S.A.
Excel	Microsoft, Redmond, U.S.A.
Vector NTI 10 <i>academic licence</i>	Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.
Endnote X4	AdeptScience, Carlsbad, U.S.A.
Jemboss	EMBOSS, <a href="http://emboss.sourceforge.net">http://emboss.sourceforge.net</a>
Pymol	Schrödinger, New York, U.S.A.

## 2. Materialien

---

fortéBIO *Data Analysis* 6.3

fortéBIO, Menlo Park, U.S.A.

fortéBIO *Data Aquisition* 6.3

fortéBIO, Menlo Park, U.S.A.

Photoshop CS 4

Adobe Systems Incorporate, San Jose, U.S.A.

Illustrator CS 4

Adobe Systems Incorporate, San Jose, U.S.A.

### 3. Methoden

#### 3.1. Mikrobiologische Arbeiten

##### 3.1.1. Vorbereitung von Geräten und Lösungen

Zur Sterilisation von hitzestabilen Geräten wurden diese für 20 min bei 121 °C erhitzt. Geräte, die nicht hitzebeständig waren, wurden mit 70 %igen (v/v) Ethanol gereinigt und getrocknet. Hitzestabile Lösungen wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Nicht hitzestabile Lösungen oder Lösungsbestandteile wurden, wenn nicht anders beschrieben, durch einen Membranfilter der Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert und anschließend der sterilen Lösung zugegeben.

##### 3.1.2. Anzucht und Vermehrung von *Escherichia coli* Stämmen

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden alle verwendeten *E. coli*-Stämme bei 37 °C in dYT-Medium vermehrt. Im Fall von plasmid- oder genomkodierter Resistenz wurden die Medien mit den entsprechenden Antibiotika komplettiert. Bei einem Volumen von bis zu 5 mL wurden die Kulturen in Kulturröhrchen angezogen. Kulturen mit einem Volumen über 10 mL wurden unter einer Thermohaube bei 150 Upm geschüttelt. Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) im Photometer ermittelt. Bei einer OD<sub>600</sub> über 1 wurden die Zellen entsprechend verdünnt und die tatsächliche Dichte aus dem Verdünnungsfaktor errechnet.

##### 3.1.3. Lagerung von *Escherichia coli* Stämmen

Zur dauerhaften Lagerung der in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli* Stämme wurden diese mit 10 % (v/v) DMSO versetzt und bei -80 °C gelagert. Zur kurzfristigen Lagerung wurden die Stämme auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Kulturplatten konnten anschließend über einen Zeitraum von vier Wochen bei 4 °C gelagert werden.

##### 3.1.4. Präparation und Transformation kompetenter *Escherichia coli* Zellen durch Elektroporation

Zur Transformation der *E. coli*-Stämme wurde standardmäßig nach der Elektroporationsmethode von Dower und Kollegen verfahren [63]. Zur einfachen

Plasmid-Vermehrung und zur Vermehrung von ligierten Plasmiden wurden 50 mL dYT mit dem entsprechenden Stamm von *Escherichia coli* von LB-Agarplatten inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Hereaus Multifuge 3L-R, 4000 Upm, 10 min, 4 °C) geerntet, in 30 mL eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Waschschrift wurde zweimal, mit einem jeweils um 10 mL verringerten Volumen an eiskalten, sterilen Wasser wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet in ca. 250 µL eiskalten, sterilen Wasser aufgenommen. Während der gesamten Prozedur wurden die Zellen auf Eis gehalten. Zur Transformation wurden zwischen 70 µL und 250 µL Zellsuspension mit einer zur gewünschten Transformantenzahl führenden DNA-Menge versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde im Gene Pulser II (BioRad) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 200 mA Stromstärke, 2,5 kV Spannung, 6.250 V/cm Feldstärke, 5 s Impuls und Raumtemperatur. Unter optimalen Bedingungen sollte die Zeitkonstante 4,5–5,0 ms betragen. Unmittelbar nach dem Potentialpuls wurde die Elektroporationsküvette mit einem Milliliter dYT-Medium gespült und der Inhalt in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde dann für eine Stunde bei 37 °C in einem Thermomixer (Eppendorf Thermomixer compact) inkubiert, um die Ausprägung der durch das Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz zu gewährleisten. Anschließend wurde die Kultur auf Selektivplatten ausgestrichen bzw. 50 mL selektives dYT-Medium mit der Kultur beimpft.

#### **3.2. Molekularbiologische Arbeiten**

##### **3.2.1. Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen mit Ethanol**

Die Fällung von DNA mit Ethanol dient der Konzentration der DNA und der Entfernung von Proteinen, Salzen und freien Nukleotiden. Diese Methode ist nicht ausreichend zur gänzlichen Entfernung von Proteinen und Salzen, jedoch ist sie für die meisten Zwecke hinreichend.

Die Fällung wird durch eine Erhöhung der Konzentration an monovalenten Kationen und gleichzeitigen Entzugs des Lösungsmittels durch Zugabe von Ethanol

erreicht. Die Erhöhung der Konzentration an monovalenten Kationen führt zu einer Erhöhung der Dielektrizitätskonstante, welche die Abstoßung des negativ geladenen Phosphodiester-Rückrats der DNA vermindert. Durch Entzug des Lösungsmittels durch die Zugabe von Ethanol wird dann die Fällung der DNA erreicht.

Die DNA-haltige Lösung wurde mit 1/10 Vol. 7 M Ammoniumacetatlösung und 3 Vol. 96 % Ethanol p.A. je nach zu erwartender DNA-Menge 1 h bis 12 h bei 20 °C gefällt und danach bei 4 °C für 30 min. und maximaler Upm zentrifugiert (Eppendorf-Kühlzentrifuge *Centrifuge* 5415 R). Das DNA-Pellet wurde einmalig mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und 10 min bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Ethanol wurde nach der Zentrifugation so gut wie möglich abgetrennt. Zusätzlich wurden die Gefäße offen für 10 min bei 37 °C im Heizblock zur Trocknung des DNA-Pellets inkubiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet je nach gewünschter Konzentration in einem entsprechenden Endvolumen sterilem bidestilliertem Wasser (H<sub>2</sub>O bidest.) aufgenommen.

#### 3.2.2. Extraktion von DNA aus wässrigen Lösungen mit organischen Lösungsmitteln

Die Extraktion von DNA mit Phenol, Phenol/Chloroform oder Chloroform dient der Entfernung von Proteinen, Ethidiumbromid oder Resten anderer hydrophober Kontaminationen aus einer DNA-Lösung. Die Extraktion mit Chloroform dient auch der Entfernung von Phenol aus der wässrigen Phase.

Zur Extraktion wurde die wässrige DNA-Lösung mit einem Vol. Phenol, Phenol/Chloroform oder Chloroform versetzt und kräftig geschüttelt. Um die organische und die wässrige Phase wieder voneinander zu trennen, wurde der Ansatz zentrifugiert (Hettich-Tischzentrifuge, 13.000 Upm, 3 min, RT). Der wässrige Überstand wurde zur weiteren Verwendung in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Wenn nicht anders beschrieben, schloss sich an einer Extraktion mit Phenol/Chloroform eine Extraktion mit Chloroform an, um eine gänzliche Entfernung des Phenols zu gewährleisten. Zuletzt wurde die DNA mit Ethanol gefällt (3.2.1.).

#### 3.2.3. Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von DNA- oder RNA-Fragmenten. In dieser Arbeit wurde sie zur Auftrennung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten verwendet. Die Agarosegelelektrophorese erfolgte stets in einem TAE gepufferten System [64]. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurde eine Konzentration von 1 % oder 2 % (w/v) Agarose verwendet. Zum Lösen der Agarose im TAE-Puffer wurde der Ansatz in einem Mikrowellenofen bis zum Siedepunkt erhitzt. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C wurde zum Anfärben der DNA 0,5 µg/mL Ethidiumbromid zugesetzt. Die so vorbereitete Agaroselösung wurde in einem abgegrenzten Bereich (100 x 7 x 0,5 mm) einer Gellaufkammer gegossen und ein Taschenkamm eingesetzt. Nach dem Erstarren des Agarosegels wurde dieses mit TAE-Puffer überschichtet. Die mit mindestens 1/6 Vol. Sucrosefarbmarker versetzten Proben wurden in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung zwischen 100 V und 120 V für 30 - 60 min durchgeführt (5 bis 10 V/cm Feldstärke). Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden im UV-Durchlicht (324 nm) durch Fluoreszenz des eingelagerten Ethidiumbromids sichtbar gemacht und fotografiert. Zur Längen- und Konzentrationsbestimmung für die resultierenden DNA-Banden wurde ein DNA-Fragmentlängenstandard (DNA-Konzentration: 100 ng/µL) verwendet. Die präparative Agarosegelelektrophorese erfolgte analog zur analytischen. Jedoch wurden Kämme mit präparativen Taschen für ein Volumen bis zu 60 µL verwendet. Die entsprechenden DNA-Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel exzidiert.

#### 3.2.4. Reinigung von DNA aus Agarosegelen mit Hilfe des *WizardSV Gel and PCR Clean-Up* Systems (Promega)

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen (3.2.3.) wurde das *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up* System von Promega benutzt. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers, jedoch wurde die DNA mit H<sub>2</sub>O bidest. eluiert. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.



#### 3.2.5. Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das *PureYield™ Plasmid Miniprep System Kit* (Promega) verwendet, welches auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen beruht. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers, jedoch wurde die DNA mit H<sub>2</sub>O bidest. eluiert. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 3.2.6. Bestimmung der Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen

Die Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen wurde mit Hilfe eines Shimadzu Spektralphotometers (UV-1650 PC) in einer Mikroküvette (Hellma, QS 1,000) bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen Wasser gemessen. Eine Absorption von 1,0 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 µg/mL. Zusätzlich wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen um eine Aussage über die Reinheit der Lösung zu machen. Proteinfreie DNA-Lösungen sollten ein Verhältnis zwischen OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> von ungefähr 2:1 haben.

#### 3.2.7. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde unter den jeweiligen vom Hersteller des Enzyms empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen durchgeführt. Gleichzeitige Spaltungen mit mehreren Enzymen wurden unter den Pufferbedingungen durchgeführt, bei denen die Restriktionsendonukleasen laut Hersteller mindestens 50 % bis 100 % Aktivität besaßen. Wenn nicht anders aufgeführt, wurde zur Spaltung DNA in einer Endkonzentration von 100 ng/µL mit 1-2 Einheiten Enzym pro µg DNA versetzt und für 1 h bei der für das Enzym empfohlenen Temperatur auf einem Heizblock inkubiert. Bei einer längeren Inkubationsdauer wurde die eingesetzte Menge an Enzym verringert und die Inkubation, wenn möglich, im Brutschrank durchgeführt.

#### 3.2.8. Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten zu einem zirkulären Ligationsprodukt wurde ein bis zu fünffach molarer Überschuss an DNA-Insert-Fragment gegenüber DNA-Vektor-Fragment eingestellt. Zur Ligation wurden 2-4 Einheiten T4-DNA Ligase und der von Fermentas (Burlington, Kanada) mitgelieferte T4-DNA

Ligasepuffer in einem Endvolumen von 20-40 µL verwendet. Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte bei 15 °C im Kühlschrank. Vor einer Transformation des Ligationsprodukts in *E. coli*-Zellen wurde dieser mit Phenol/Chloroform extrahiert (3.2.2.) und mit Ethanol gefällt (3.2.1.).

#### 3.2.9. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die *polymerase chain reaction* (PCR) ist eine *in vitro*-Methode, die es ermöglicht spezifische DNA-Fragmente aus einem komplexen DNA-Gemisch enzymatisch zu amplifizieren [65-67]. Im ersten Schritt der PCR wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen in einzelsträngige DNA überführt (Denaturierung). Durch Absenken der Temperatur können sich zwei Oligonukleotid-Primer an die Matrizen-DNA anlagern (Primer-*Annealing*). Die Oligonukleotid-Primer wurden so ausgewählt, dass sie die zu amplifizierende Region flankieren. Im dritten Schritt der PCR werden die beiden Primer mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase, bei ihrem Temperaturoptimum, komplementär zur ursprünglichen doppelsträngigen DNA verlängert (Primer-Extension). Es wird zur Amplifikation eine bestimmte Anzahl an Zyklen durchgeführt, wodurch die von den Primern flankierte Region exponentiell akkumuliert wird.

Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µL durchgeführt. Als Matrize wurde ca. 5-20 ng DNA eingesetzt. Diese wurde zusammen mit dem Reaktionspuffer in einem Endvolumen von 25 µL in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit ca. 15 µL *Chill Out 14*® Flüssigwachs überschichtet um die Evaporation der Flüssigkeit während der Amplifikationszyklen zu verhindern. Dieser Ansatz wurde im PCR-Gerät für 2 min. bei 98 °C erhitzt, um eine vollständige Denaturierung der Matrizen-DNA zu gewährleisten. Diese als *Hot Start*-PCR bezeichnete Abwandlung der konventionellen PCR ermöglicht eine höhere Spezifität durch Vermeidung von Primer-Fehlpaarungen [68]. Dem denaturierenden Schritt schloss sich ein Pausenschritt bei 85 °C an, welcher der Zugabe der restlichen Komponenten der PCR diente. Dafür wurden 2,5 µL zehnfach konzentrierter Reaktionspuffer, 1 µL dNTPs (10 mM), jeweils 1 µL der Primer (10 M) und eine Einheit der thermostabilen DNA-Polymerase zum Reaktionsansatz zugegeben. Das Gesamtvolumen wurde mit Wasser auf 25 µL gebracht.

Die Bedingungen der einzelnen Reaktionsschritte mussten an die Länge der zu amplifizierenden Sequenz, sowie an die Länge und den G/C-Gehalt der verwendeten Primer angepasst werden. Der Schritt bei der die Primer verlängert werden (*Primer-Extension*) wurde bei 72 °C durchgeführt. Die Elongationszeit wurde so gewählt, dass sie 60 s pro 1000 bp betrug. Es wurden stets 30 Zyklen durchgeführt. Die Schmelztemperatur  $T_M$  eines Oligonukleotids wurde nach folgender empirischen Formel (3.1) berechnet. Bei dieser Formel wird sowohl der relative G/C-Gehalt (% G/C) als auch die Länge des Oligonukleotids (n) berücksichtigt.

$$T_M [^{\circ}C] = 69,3 + 0,41 \cdot (\%G/C) - \frac{650}{n} \quad (3.1)$$

Die optimale *Annealing*-Temperatur  $T_A$  für eine Polymerasekettenreaktion wurde nach (3.2) bestimmt.

$$T_A = \frac{(T_{M1} + T_{M2})}{2} - 3^{\circ}C \quad (3.2)$$

$T_{M1}$  und  $T_{M2}$  stehen dabei für die Schmelztemperatur der beiden verwendeten *Primer*. Die zyklische Denaturierung erfolgte in der Regel bei 94 °C für 30 s. Das *Primer-Annealing* erfolgte in der Regel für 30 s. Für die PCR wurde ein *Mastercycler personal* (Eppendorf) verwendet. Für den präparativen Gebrauch der PCR wurden die Reaktionsansätze ggf. vereint und mit Phenol/Chloroform extrahiert (3.2.2.) und mit Ethanol gefällt (3.2.1.).

### 3.3. Proteinchemische Arbeiten

#### 3.3.1. Expressionsanalyse ausgewählter Klone

Bevor eine Expression im präparativen Maßstab durchgeführt wurde, erfolgt eine Analyse einzelner Klone im analytischen Maßstab. Diese Expressionsanalyse wurde für alle zu exprimierenden Konstrukte durchgeführt, da die Sequenzanalyse der vermeintlich positiven Klone nur auf den neu klonierten Bereich des Plasmids beschränkt wurde. Daher kann die Expression durch Mutationen außerhalb dieses Bereiches z.B. im Promotor, im Resistenzgen oder im Replikationsursprung eingeschränkt werden. Zudem kann es zu Mutationen nach der Klonierung z.B. bei

der Vermehrung der Plasmide kommen, welche zu einem unvollständigen Protein oder oben genannten Einschränkungen führen können. Für die Analyse wurden jeweils 5 mL dYT-Medium mit 50 µL einer Übernacht-Kultur von Einzelklonen inokuliert. Die Inkubation der Zellsuspension erfolgte analog zu den jeweiligen Expressionsbedingungen der zu analysierenden Konstrukte (siehe 3.3.2. und 3.3.3.) im temperierbaren Schüttler. Vor der Induktion mit IPTG wurde ein Aliquot genommen. Nach der Induktion der Expression wurden je 120 µL Zellsuspension á OD<sub>600</sub>=1 zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde entweder bei -20°C gelagert oder direkt einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zugeführt. Von ausgewählten Klonen wurden DMSO-Kulturen hergestellt und bei -20°C gelagert.

#### 3.3.2. Expression solitärer Tim10- und Tim9-Untereinheiten

Die Expression der GST-Tim10 Fusion erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3). Das LB-Medium wurde hierfür mit Ampicillin und Chloramphenikol komplettiert. Die Expression der GST-Tim9 Fusion erfolgte im *E. coli*-Stamm Origami (DE3) pLysS, welcher die Bildung von Disulfidbrücken im Cytosol begünstigt. Das LB-Medium wurde hierfür mit Ampicillin, Kanamycin, Tetrazyklin und Chloramphenikol komplettiert. Für die Expression der solitären Tim10- und Tim9-Untereinheiten als Glutathion-S-Transferase-Fusion wurden jeweils 50 mL LB-Medium mit 100 µL Gefrierkultur inokuliert und bei 37°C (Tim10-Untereinheit) bzw. 28°C (Tim9-Untereinheit) inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurde mit dieser Vorkultur jeweils 1 L LB-Medium inokuliert und bei gleicher Temperatur und 150 Upm inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,3 wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Tim10-Untereinheit) bzw. 0,5 mM IPTG (Tim9-Untereinheit) induziert und die Temperatur auf 30°C (Tim10-Untereinheit) bzw. 25°C (Tim9-Untereinheit) gesenkt. Die Induktion erfolgte für 4 h. Die Zellen wurden bei 4°C für 20 min. in der Zentrifuge pelletiert (Sigma 6K15, Rotor 12500). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 20 mL PBS je Liter Zellkultur aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert oder direkt mit Hilfe der French® Press aufgeschlossen (3.3.4).

#### 3.3.3. Bicistronische oder duale Expression funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe

Die bicistronische und duale Expression erfolgte im *E. coli*-Stamm SHuffle T7, welcher die Bildung von Disulfidbrücken im Cytosol begünstigt. Hiefür wurde das verwendete LB-Medium mit Ampicillin komplettiert. Zunächst wurde 50 mL LB<sub>Amp</sub>-Medium mit 100 µL Gefrierkultur inokuliert und bei 28°C und 150 Upm inkubiert. Bei einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,5 wurde der gesamte Ansatz in 1 L LB<sub>Amp</sub>-Medium überführt und bei 28°C und 150 Upm weiter inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4 wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG in Endkonzentration für 4 h bei 25°C induziert. Die Zellen wurden bei 4°C für 20 min. in der Zentrifuge pelletiert (Sigma 6K15, Rotor 12500). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 20 mL PBS (GST-Fusion) bzw. 20 mL IMAC A-Puffer (Polyhistidin-*tag*) je Liter Zellkultur aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert oder direkt mit Hilfe der French® Press aufgeschlossen (3.3.4).

#### 3.3.4. Aufschluss von *Escherichia coli*-Zellen mittels French® Press

Zum Aufschluss der *E. coli*-Zellen wurde ein Hochdruckhomogenisator (French® Press) verwendet [69]. Dafür wurde die *E. coli*-Zellsuspension luftblasenfrei in die auf 4°C vorgekühlte Aufschlußbombe gefüllt. Die Bombe wurde in die French® Press eingespannt und ein Druck von 8,26 MPa (1200 *pound-force per square inch*) eingestellt. Die Flussrate wurde mit dem Auslassventil so eingestellt, dass die Zellsuspension nur tröpfchenweise aus der French® Press entlassen wurde. Das Auffanggefäß wurde dabei auf Eis gekühlt. Um einen kompletten Aufschluß zu garantieren, wurde dieser Vorgang bis zu vier mal wiederholt.

#### 3.3.5. Konzentration von Proteinen durch Ultrafiltration

Zur Erhöhung der Konzentration von Proteinen wurde für Volumen bis 2 mL Amicon Centricon Ultrafiltrationseinheiten (Millipore, MWCO: 3000) und für Volumen über 2 mL Vivaspin 15 Ultrafiltrationseinheiten (Sartorius, MWCO: 10000) verwendet. Die Ultrafiltration erfolgte nach Anweisung der Hersteller bis zur gewünschten Konzentration.

#### 3.3.6. Bestimmung der Proteinkonzentration in wässrigen Lösungen

Die Konzentration von Proteinen in einer wässrigen Lösung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm gegen das Lösungsmittel gemessen. Die Berechnung des Extinktionskoeffizienten erfolgte durch das Programm *Vector NTI* (Invitrogen).

#### 3.3.7. Spaltung von rekombinant synthetisierten Proteinen mit TEV-Protease

Zur spezifischen Spaltung von rekombinant synthetisierten Proteinen wurde eine Protease aus dem *tabacco etch virus* (TEV-Protease) verwendet. Die TEV-Protease spaltet spezifisch in der Erkennungssequenz E-N-L-Y-F-Q-G/S C-terminal nach dem Glutamin [70]. Die letzte Aminosäure der Erkennungssequenz kann zwischen Serin und Glycin alternieren [71, 72]. Für eine spätere chemische Funktionalisierung des N-Terminus rekombinant synthetisierte Proteine wurde in dieser Arbeit ausschließlich die Erkennungssequenz E-N-L-Y-F-Q-S verwendet. Für die Spaltung wurden die Proteinlösungen mit 1/10 Vol. TEV-Protease (rekombinant hergestellt von J. Fritz und T. Hofmeyer, TU Darmstadt) und 1/10 Vol. TEV-Protease-Puffer versetzt. Die Inkubation wurde bei 30°C über Nacht durchgeführt.

#### 3.3.8. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine und Proteingemische wurden zur Analyse auf eine diskontinuierliche denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetragen [73-75]. Dabei wurde Natrium-Dodecylsulfat (*sodium dodecylsulfate*, SDS) als Detergenz eingesetzt. In dieser Arbeit wurde die modifizierte Methode nach Schagger benutzt, welche eine Auftrennung kleiner Proteine ermöglicht. Zum Gießen der Gele wurde eine Gelgießkammer (Hoefer *Scientific* SE 250) für 5-10 Gele verwendet. Die Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele ist in Tabelle 3.1 angegeben. Um einen Kapillareffekt an den Gelrändern entgegenzuwirken, wurden die Trenngele nach dem Gießen bis zur vollständigen Polymerisation mit Isopropanol überschichtet.

### 3. Methoden

**Tabelle 3.1:** Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel nach Schagger und Kollegen [75]. Angaben für 10 Gele.

Lösung	Trenngel	Sammelgel
30 % (w/v) Acrylamid/0,8% Bisacrylamid (Rotiphorese® Gel 30)	40 mL	3,2 mL
3M Tris/HCl pH 8,45, 0,3 % SDS	20 mL	6,2 mL
H <sub>2</sub> O bidest.	-	15,2 mL
10% Ammoniumperoxodisulfat (aq.)	200 µL	200 µL
TEMED	30 µL	30 µL

Das Gel wurde in die Gellaufkammer eingesetzt und mit Kathodenpuffer (0,1 M Tris, 0,1 M Tricine, 0,1 % SDS) überschichtet. Nachdem der Taschenkamm entfernt wurde, wurde der Anodenpuffer (0,2 M Tris/HCl pH 8,9) in die entsprechende Kammer gefüllt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/5 Volumen HOECHST-Puffer versetzt, für 10 min bei 99°C erhitzt und auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Wenn nicht anders beschrieben, wurde zum Größenvergleich der *Unstained Molecular Weight Marker* (Fermentas GmbH) mitgeführt. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 30 mA je Gel und maximal eingestellter Spannung durchgeführt. Die Detektion der Proteine im Gel erfolgte durch Färben mit Coomassie Brilliantblau R-250, welches unspezifisch an basische Seitenketten von Proteinen bindet [76, 77]. Dafür wurde das Gel für 10 min. in PAG-Färbelösung inkubiert. Zum Entfärben wurde das Gel zunächst für 3 mal 5 min in der Mikrowelle mit 3/4 der maximalen Leistung in Wasser gekocht. Das Wasser wurde nach jedem Kochvorgang gewechselt. Zum Schluß erfolgte eine weitere Entfärbung mit PAG-Entfärbelösung.

#### 3.3.9. Blau-native Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE)

Die blau-native Polyacrylamidgelelektrophorese wurde ursprünglich zur Isolierung hochmolekularer mitochondrialer Membranproteine und Komplexe entwickelt [74, 78, 79]. Jedoch ermöglicht sie auch eine einfache Analyse der Oligomerisierung verschiedener Proteine. Zum Gießen der Gele wurde eine Gelgießkammer (Hoefer *Scientific* SE 250) für 5-10 Gele verwendet. Die Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele ist in Tabelle 3.2 angegeben.

### 3. Methoden

**Tabelle 3.2:** Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel. Angaben für 10 Gele.

Lösung	Trenngel	Sammelgel
30 % (w/v) Acrylamid/0,8% Bisacrylamid (Rotiphorese® Gel 30)	28 mL	1,4 mL
1M Aminocapronsäure pH7	32 mL	5 mL
1M Bis-Tris pH 7	3,2 mL	500 µL
H <sub>2</sub> O bidest.	400 µL	3,2 mL
10% Ammoniumperoxodisulfat (aq.)	200 µL	200 µL
TEMED	30 µL	30 µL

Die Gele wurden in die Gellaufkammer eingesetzt, mit Kathodenpuffer (50 mM Tricin, 15 mM Bis-Tris, 0,02% Coomassie Brilliantblau G-250) überschichtet und der Taschenkamm entfernt. Anschließend wurde der Anodenpuffer (50 mM Bis-Tris pH7) in die entsprechende Kammer eingefüllt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/5 Volumen BN-PAGE-Farbmarker versetzt und direkt auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde zunächst bei 100 V und maximaler Stromstärke durchgeführt bis die Proben in das Trenngel eingelaufen sind. Dann wurde die Stromstärke auf 15 mA limitiert und die maximale Spannung eingestellt. Die Gelelektrophorese ist nach Auslaufen der Farbmarkerbanden aus dem Gel abgeschlossen. Die Färbung und Entfärbung des Gels erfolgt analog zu der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

#### 3.3.10. Western-Blot-Analyse

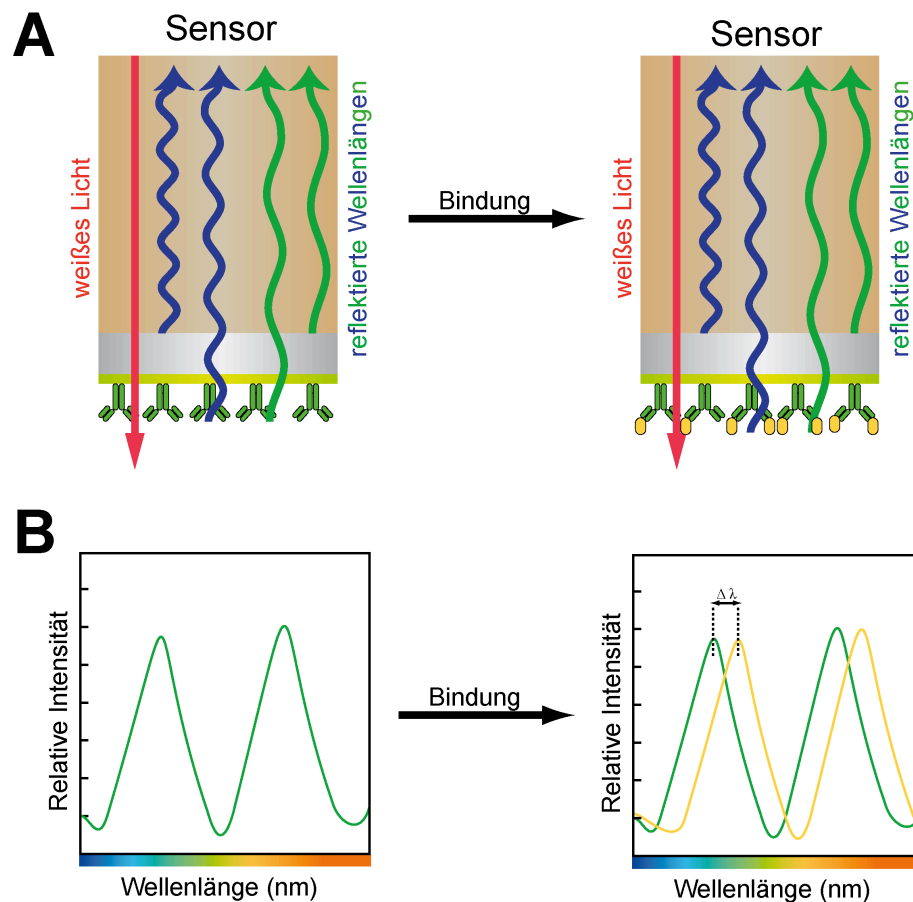
Zur spezifischen Detektion von geringen Mengen an Protein eignet sich die Western-Blot-Analyse [80-83]. Dabei werden Proteine nachdem sie durch SDS-Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt wurden auf eine Nitrozellulosemembran durch *Elektroblotting* transferiert und durch eine alkalische Phosphatase gekoppelte Immunfärbung detektiert. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Western-Blotanalysen wurden die zu untersuchenden Proteine zunächst durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (3.3.7.). Als Längenstandard wurde der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* von Fermentas verwendet. Die SDS-PAGE erfolgte stets in doppelter Ausführung. Ein Gel wurde mit Coomassie gefärbt, das zweite Gel wurde im *semi-dry blot* Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Zunächst wurde das verwendete Gel,



Whatmanpapier und eine Nitrozellulosemembran in Transferpuffer eingelegt. Auf einer Transferapparatur wurden dann vier Whatmanpapiere, eine Nitrozellulosemembran, das SDS-Polyacrylamidgel und abschließend vier Whatmanpapiere übereinandergeschichtet. Die Transferapparatur wurde verschlossen und der Transfer bei konstanten 10 V und maximaler Stromstärke durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran zur Entfernung von Gelresten in PBS Puffer geschwenkt und anschließend über Nacht mit 3% Milchpulver in PBS geblockt. Die Membran wurde dann 3x in PBS-T Puffer (0,05% Tween® 20 in PBS) gewaschen und mit dem primären Antikörper in 1,5% Milchpulver in PBS für mindestens 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach wiederholtem Waschen der Membran erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper in PBS Puffer für mindestens 1 h bei RT. Da der sekundäre Antikörper mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist, konnte die spezifische Bindung an die Proteine mit den Reagenzien 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) nachgewiesen werden. BCIP wird durch die alkalische Phosphatase und anschließender Oxidation zu einem Indigofarbstoff umgesetzt. NBT wird dabei zu einem blauen Farbstoff reduziert und verstärkt damit die Sensivität der Detektion. Zur Unterbrechung der Reaktion wurde die Membran in PBS überführt. Die Dokumentation erfolgte durch die Geldokumentationsanlage (Intas *Gel Jet Imager*).

#### 3.3.11. Messung von Protein-Protein-Wechselwirkungen durch *Biolayer* Interferometrie

Die *Biolayer* Interferometrie ermöglicht die Messung biomolekularer Wechselwirkungen. In dieser Arbeit wurde das Octed *Red System* von fortéBIO zur Bestimmung der Avidität zwischen funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexen und Rezeptoren verwendet. Ein Schema der Funktionsweise ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Bei der Biolayer Interferometrie wird die Differenz zwischen zwei Interferenzmustern von weißem Licht zur Bestimmung einer Bindung genutzt. Dabei wird ein Interferenzmuster, welches durch die Reflektion von einer Referenzschicht (Abbildung 3.1 A, graue Schicht) und ein Interferenzmuster, welches durch die Reflektion einer Bindeschicht (Abbildung 3.1 A, grüne Schicht) erzeugt wird miteinander verglichen.



**Abb. 3.1:** Schematische Darstellung der *Biolayer* Interferometrie. **A:** Schematische Abläufe im Sensor bei Bindung von Molekülen an eine Bindschicht (grün). Interferenz (grüner und blauer Pfeil) von weißem Licht (roter Pfeil) reflektiert von einer Referenzschicht (grau) und einer Bindschicht. **B:** Schematische Darstellung der Verschiebung des Interferenzmusters bei Bindung an den *Biolayer* Interferometriesensor. Interferenzmuster vor Bindung (grün) und Interferenzmuster nach Bindung (gelb). Modifiziert nach [www.fortebio.com](http://www.fortebio.com).

Bindet ein Molekül an die Bindschicht, führt dies zu einer Erhöhung der optischen Dicke und Dichte, die direkt proportional zur Schichtdicke und -dichte sind. Dies führt zu einer Verschiebung in der Wellenlänge der Interferenzmuster (Abbildung 3.1 B), welche in Echtzeit gemessen werden kann. Diese Veränderung in der Wellenlänge ist unabhängig von ungebundenen Molekülen in der Lösung, welches prinzipiell eine Messung von Rohextrakten ermöglicht. Da die Messung hauptsächlich von der Schichtdicke und nur zu einem geringen Teil von der Schichtdichte abhängig ist, wird in dieser Arbeit die Bindung als relativer Schichtdickenzuwachs bezeichnet.

Bei Rezeptoren, die als Fc-Chimäre vorlagen, wurden ProteinA-Sensoren und bei nicht funktionalisierten Rezeptoren wurden aminoreaktive Sensoren verwendet.

### 3. Methoden

Das entsprechende Programm zur Immobilisierung von Fc-Rezeptor-Chimären ist in Tabelle 3.3 aufgeführt.

**Tabelle 3.3:** Programmablauf bei Verwendung von ProteinA-Sensoren

Schritt	Lösung	Upm	t [s]
<i>Baseline</i>	PBS	1000	180
Immobilisierung	Rezeptor in PBS	1000	600
<i>Baseline</i>	PBS	1000	180
Assoziation	Analyt in PBS	1000	600
Dissoziation	PBS	1000	600

Die Programmschritte zur Verwendung von aminoreaktiven Sensoren sind in Tabelle 3.4 angegeben.

**Tabelle 3.4:** Programmablauf bei Verwendung von aminoreaktiven Sensoren

Schritt	Lösung	Upm	t [s]
<i>Baseline</i>	100 mM MES-Puffer pH 6	1000	180
Aktivierung	EDC/NHS	1000	300
Immobilisierung	Rezeptor in 100 mM MES-Puffer pH 6	1000	900
<i>Quenching</i>	1M Ethanolamin	1000	300
<i>Baseline</i>	PBS	1000	180
Assoziation	Analyt in PBS	1000	900
Dissoziation	PBS	1000	900

Für die Messung wurde eine serielle Konzentrationsreihe der Analyten angefertigt. Dabei wurde die Konzentrationsreihe im Bereich der erwarteten Dissoziationskonstante angelegt. Bei jeder Messung wurde eine Negativkontrolle in der höchsten verwendeten Konzentration des Analyten mitgeführt. Die Negativkontrolle entsprach dabei dem Analyten mit ausgetauschtem Bindemotif.

Die Auswertung der Messung erfolgte mit der Software fortéBIO Analysis 6.3. Zum Prozessieren der Rohdaten wurde die Negativkontrolle von allen anderen Rohdaten abgezogen. Bei Verwendung von mehreren Negativkontrollen wurde ein Mittelwert gebildet. Die prozessierten Werte wurden weiterhin auf die gemessene Basislinie und anschließend auf die Dissoziation angeglichen. Zur Glättung der Messreihe wurde eine Savitzky-Golay-Filterung durchgeführt. Die so prozessierten

Daten wurden dem *Fitting* zugeführt. Die Software bietet für das *Fitting* 1:1, 1:2 Modelle und Modelle zur Berechnung von Stoffübergängen (*mass transport*) an. Für die in dieser Arbeit gemessenen funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe wurde das 1:1 Modell verwendet. Weiterhin wurde eine lokale Berechnung (*local*) über einzelnen Sensoren eingestellt. Diese Einstellung ergab einzelne Dissoziationskonstanten, welche nach Auswertung des *Fittings* gemittelt wurden.

#### 3.4. Säulenchromatographie

##### 3.4.1. Isolierung von GST-Fusionsproteinen aus *E. coli*-Zellextrakten durch Glutathionaffinitätschromatographie

Zur Isolierung von GST-Fusionsproteinen aus Zellextrakten wurde die Glutathionaffinitätschromatographie verwendet. Das Packen der Chromatographiesäule erfolgte nach Angaben des Herstellers mit einem Bettvolumen von 2 mL (Invitrogen, Molecular Probes® *Glutathione Agarose*). Nach der Equilibrierung der Säule mit 5 Säulenvolumen (SV) PBS, wurde diese mit dem gesamten Zellextrakt (3.3.4.) beladen und anschließend mit 5 SV PBS gewaschen. Das gewünschte Protein wurde mit bis zu 4 SV Elutionspuffer eluiert und á 1 SV fraktioniert. Abschließend erfolgte eine Regeneration der Säule mit 5 SV Regenerationspuffer und 5 SV PBS. Die Lagerung der Säule erfolgte in 20% Ethanol im Kühlschrank. Jeder Chromatographieschritt wurde separat gesammelt. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Fraktionen bei 4°C gelagert oder direkt einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zugeführt (3.3.7.). War für die weitere Verwendung ein Pufferwechsel notwendig, wurden die Proteinlösungen im Anschluss gegen mindestens das 250-fache an entsprechenden Puffer dialysiert. Die Dialyse erfolgte bei 4°C über Nacht.

##### 3.4.2. Isolierung von Proteinen mit Polyhistidin-*tag* aus *E. coli*-Zellextrakten durch immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)

Als Säulenmatrix für die immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie wurde *Chelating Sepharose™ Fast Flow* (GE Healthcare) verwendet. Die Chromatographiesäule wurde nach Angaben des Herstellers mit einem Bettvolumen von 2 mL gepackt. Zunächst wurde die Säule mit 5 SV 100 mM NiCl<sub>2</sub> Lösung beladen und anschließend mit 5 SV H<sub>2</sub>O und 5 SV IMAC A Puffer

equilibriert. Nach der Beladung der Säule mit dem gesamten Zellextrakt erfolgte ein Waschschrift mit 10 SV IMAC A Puffer. Die Elution erfolgte als Stufengradient mit jeweils 10 SV 20 und 60 mM Imidazol in IMAC A Puffer und jeweils 5 SV 100, 120, 200, 500 und 1000 mM Imidazol in IMAC A Puffer. Abschließend wurde die Säule mit IMAC A Puffer regeneriert und bis zur weiteren Verwendung in 20% Ethanol im Kühlschrank gelagert. Jede Fraktion wurde separat gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert oder direkt einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (3.3.7.) zugeführt. War für die weitere Verwendung ein Pufferwechsel notwendig, wurden die Proteinlösungen im Anschluss gegen mindestens das 250-fache an entsprechenden Puffer dialysiert. Die Dialyse erfolgte bei 4°C über Nacht.

#### 3.4.3. Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltrationschromatographie (GFC), auch Größenausschlusschromatographie oder Gelpermeationschromatographie genannt, ermöglicht, neben der Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer Größe, eine einfache Möglichkeit Oligomerisierungen zu analysieren, und Größen von Proteinen zu bestimmen. Daher wird in dieser Arbeit zwischen der analytischen und präparativen Gelfiltrationschromatographie unterschieden.

Für die analytische GFC wurde eine BioSep-SEC-S 2000 Säule (7,8 x 300 mm, Phenomenex®) an einer Kontron HPLC Einheit verwendet. Als Laufpuffer wurde, wenn nicht anders beschrieben, 150 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8 verwendet. Die Flussrate wurde auf 0,75 mL/min eingestellt und die OD<sub>280</sub>, OD<sub>220</sub> und OD<sub>485</sub> über einen Zeitraum von 30 min aufgezeichnet. Zur Kalibrierung der Säule wurde das *Gel Filtration Calibration Kit - Low Molecular Weight* (GE Healthcare) benutzt. Eine Kalibrierung erfolgte vor jedem analytischen Lauf.

Für die präparative HPLC wurde eine HiLoad 16/60 Superdex 75 oder 200 pg (GE Healthcare) verwendet. Die Chromatographie wurde an einer Äkta Basic (GE Healthcare) durchgeführt. Die Flussrate wurde auf 1 mL/min eingestellt. Als Laufpuffer wurde PBS verwendet. Der Chromatographielauf wurde über einen Zeitraum von bis zu 2,5 Stunden dokumentiert. *Peaks* wurden manuell gesammelt.

#### 3.5. Zellkulturarbeiten

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter Verwendung von Standardmethoden nach Lindl und Bauer [84]. Abweichungen sind im Folgenden aufgeführt.

##### 3.5.1. Kultivierung von M-07e Zellen

M-07e Zellen wurden in RFG-rhTPO Medium in Suspension kultiviert. Die Zellen wurden etwa jeden dritten Tag oder spätestens bei Veränderung des pH-Wertes (Umschlag des im Medium enthaltenen Farbstoffes von rot nach gelb) einem Mediumwechsel unterzogen. Dafür wurden die Zellen in ein steriles 50 mL Röhrchen überführt und bei 1000 Upm für 5 min pelletiert (Hereaus, Microfuge 1.0 Zentrifuge). Der Überstand wurde abgezogen und das Zellpellet in vorgewärmten RFG-rhTPO Medium aufgenommen. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

##### 3.5.2. Kultivierung von M-07e Zellen aus einer Gefrierkultur

Bei der Kultivierung von Zellen aus Gefrierkulturen (DMSO-Kultur) wurden die Zellen zunächst auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 1000 Upm für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 3x in 1 mL RPMI 1640 gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in RFG-rhTPO Medium auf eine Zellzahl von 10<sup>5</sup> Zellen/mL verdünnt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach spätestens einer Woche wurde das Medium mit einer äquivalenten Menge an rhTPO supplementiert. Alternativ wurden die Zellen zunächst in RFG-GMCSF Medium aufgenommen und analog inkubiert. Nach 1 bis 2 Wochen Wachstum wurde auf eine Konditionierung auf rhTPO umgestellt.

##### 3.5.3. Bestimmung der Zellzahl mittels Thoma Zählkammer (Ausschlussfärbung)

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Ausschlussfärbung mit einer 4%igen Trypanblaulösung in einer Thoma Zählkammer. Mit dieser Methode lässt sich die Lebendzellzahl bestimmen.

##### 3.5.4. Zellproliferationsanalyse

In dieser Arbeit wurde die hier beschriebene Zellproliferationsanalyse sowohl für die Analyse einer antagonistischen als auch agonistischen Aktivität der

Testsubstanzen verwendet. Für die Zellproliferationsanalyse wurde die auf rhTPO konditionierten Zellen zunächst geerntet und mit 3 mal 5 mL RPMI 1640 gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in RFG-Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt (3.5.3.). Je  $5 \cdot 10^4$  Zellen wurden in einem Volumen von 100  $\mu$ L in je eine Kavität ausgesät und zunächst ohne weiteres Mitogen für 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Zur Analyse der agonistischen Aktivität erfolgte eine Zugabe von rhTPO (0,001-1 nM) und der Testsubstanzen (0,01-1000 nM) jeweils in einer Konzentrationsreihe. Die Verdünnung des rhTPOs und der Testsubstanzen erfolgte in RFG-Medium in einem Endvolumen von 20  $\mu$ L. Als Kontrollen wurden Zellen sowohl mit 20  $\mu$ L RFG-Medium, als auch mit 20  $\mu$ L PBS versetzt. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 72 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Bei der Analyse der antagonistischen Aktivität erfolgte eine 2stündige Präinkubation der Zellen mit 1 nM rhTPO in Endkonzentration. Anschließend wurden die Testsubstanzen in einer Konzentrationsreihe (0,01-1000 nM) in jeweils 20  $\mu$ L Endvolumen zugegeben. Die Verdünnung der Testsubstanzen erfolgte in RFG-Medium. Die Zellen wurden weitere 72 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die Auswertung der Zellproliferationsanalyse erfolgte mit einer colorimetrischen Methode (*CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*, Promega). Dafür wurde jeder Kavität 20  $\mu$ L der Assaylösung zugegeben und weitere 4-6 h bis zu einem erkennbaren Farbumschlag inkubiert. Das Auslesen der Analyse erfolgte mit dem *FLUOstar Reader* (BMG Labtech). Die Auswertung wurde mit Excel (Microsoft®, Redmond, U.S.A) durchgeführt. Das Berechnen der Angleichungskurven zur Auswertung der Untersuchungen zur agonistischen Aktivität erfolgte für das rhTPO mit einem sigmoidalen Modell und für die untersuchten funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe mit einem Modell, das die Rezeptordimerisierung durch bivalente Liganden mit selbstantagonistischen Effekt beschreibt [85]. Die Berechnungen erfolgten durch Dr. Sebastian Krause (Invigate GmbH, Jena).

### 4. Ergebnisse

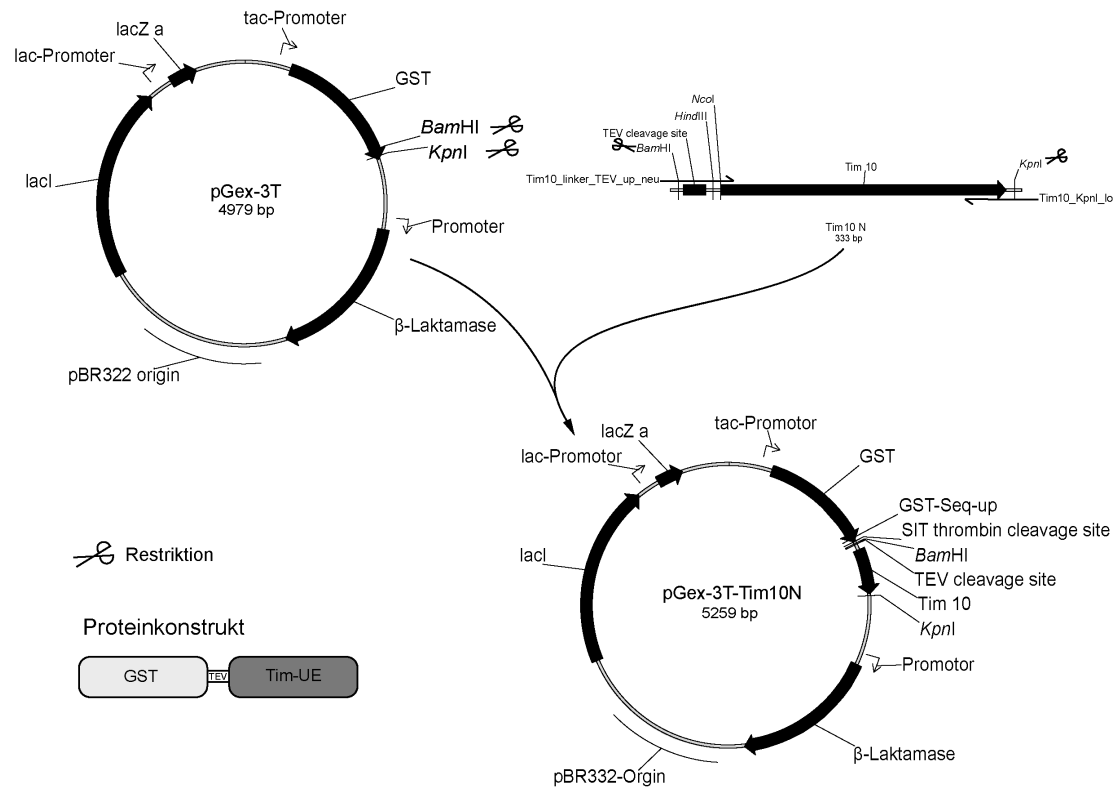
#### 4.1. Aufbau eines universellen rekombinanten Syntheseverfahrens zur Bereitstellung funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe

Für die Bereitstellung von funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexen musste zunächst ein stabiles Expressionssystem aufgebaut werden. In der Literatur wird die singuläre Produktion von Tim10 und Tim9 meist als GST-Fusion beschrieben [57, 58, 86]. Durch eine singuläre Produktion würde durch die einfache Kombination verschiedener funktionalisierter Untereinheiten ein Baukastensystem ermöglicht werden. Jedoch fällt bei einer singulären Produktion der Untereinheiten die Tim9-Untereinheit hauptsächlich als *inclusion bodies* an und nur zu einem geringen Anteil als lösliches Protein [58]. Daher wurde zunächst überprüft, ob eine singuläre Produktion funktionalisierter Untereinheit in ausreichender Menge möglich ist.

##### 4.1.1. Untersuchungen zur singulären Expression von Tim9- und Tim10-Untereinheiten

Für die rekombinante Synthese der Untereinheiten wurde wie in der Literatur beschrieben eine GST-Fusion verwendet. Für die Tim10-Untereinheit wurde die kodierende Sequenz des Tim10-Gens in den Kontext des Expressionsvektors pGex3T kloniert. Der Vektor pGex3T ermöglicht die Expression eines Gens als Fusion mit der Glutathion-S-Transferase unter der Kontrolle eines tac-Promotors. Die Fusion an die Glutathion-S-Transferase ermöglicht eine spätere Reinigung des Fusionsproteins über eine Glutathion-Affinitätschromatographie. Ein Schema der geplanten Klonierung ist in Abbildung 4.1.1 dargestellt. Das Tim10-Gen wurde mit den Oligonukleotiden Tim10\_linker\_TEV\_up\_neu und Tim10\_KpnI\_lo amplifiziert (3.2.9.) und mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Kpn*I restrigiert (3.2.7.). Der Vektor wurde analog restrigiert und präparativ über ein Agarosegel gereinigt (3.2.4.). Die so vorbereiteten Edukte wurden wie in 3.2.8. beschrieben zur Ligation eingesetzt. Der gesamte Ligationsansatz wurde zur Transformation elektrokompenter *E. coli* Top10 Zellen eingesetzt (3.1.4.). Die Analyse einzelner Klone erfolgte durch Restriktionsspaltung der Plasmid-DNA mit dem Enzym *Nco*I (3.2.7.).



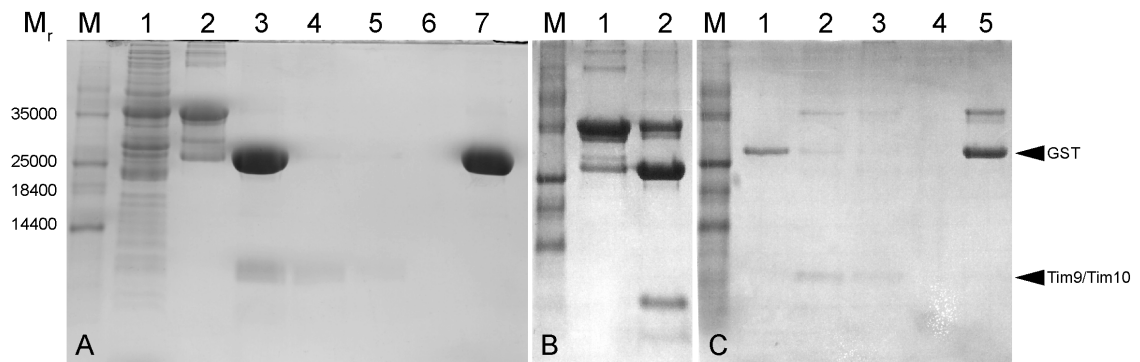


**Abbildung 4.1.1:** Klonierungsschema des Vektors pGex3T-Tim10N. GST: Gluthation-S-Transferase, TEV: Erkennungssequenz der TEV-Protease, Tim-UE: Tim9- oder Tim10-Untereinheit

Die Sequenz vermeintlich positiver Klone wurde durch Sequenzanalyse mit dem Oligonukleotid GST-Seq-up überprüft. Die Klonierung der Tim9 Untereinheit erfolgte analog unter der Verwendung der Oligonukleotide Tim9\_BamHI\_TEV\_up und Tim9\_NcoI\_HindIII\_lo für die Amplifikation des Tim9-Gens und den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III für die Klonierung in den Vektorhintergrund des Plasmides pGex3T.

Die Expression der Untereinheiten als GST-Fusion erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) für Tim10 wie in [58] beschrieben bzw. Origami (DE3) pLysS für Tim9 wie in [57] beschrieben in je 1 L LB-Medium (3.3.2.). Der Zellaufschluss erfolgte durch French® *pressing* (3.3.4.). Die Isolierung des Fusionsproteins aus dem Zellextrakt erfolgte über eine Glutathionaffinitätssäule (3.4.1.). Zur Überprüfung der Isolierung wurde ein Aliquot jeder Fraktion auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (3.3.8.). Die Fraktionen, welche das gewünschte Fusionsprotein beinhalten, wurden vereint und über Nacht gegen PBS dialysiert. Für die Dialyse wurde ein Schlauch mit einer molekularen Ausschlussgrenze (MWCO) von 14000 verwendet (Visking® 20/32). Die Abtrennung des GST-Anhängsels erfolgte

anschließend durch proteolytische Spaltung mit TEV-Protease (3.3.7.) und erneuter Reinigung über eine Glutathionsäule (3.4.1.). Dabei wurde der Durchfluss und Waschschrift gesondert aufgenommen. Von jedem Isolierungsschritt wurde ein Aliquot durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (3.3.8., Abbildung 4.1.2 A-C).

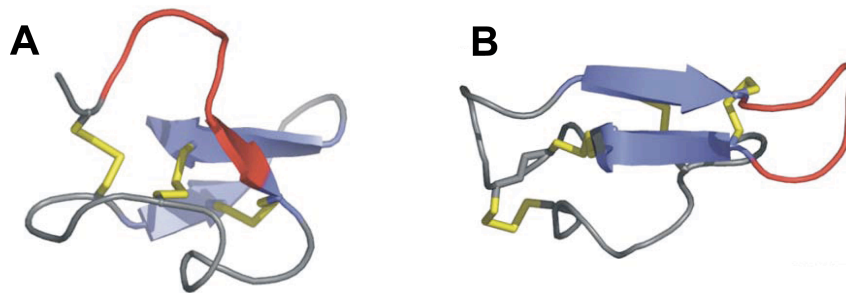


**Abbildung 4.1.2:** SDS-PAGE der Isolierung solitärer Tim-Untereinheiten als GST-Fusion. M = Fermentas® *Molecular Weight Marker*. **A:** Fraktionen der einzelnen Isolierungsschritte der Tim10-Untereinheit, 1: Rohextrakt, 2: Nach Glutathionaffinitätschromatographie, 3: Nach der proteolytischen Spaltung mit TEV-Protease, 4: Durchfluss einer zweiten Glutathionaffinitätschromatographie nach proteolytischer Spaltung mit TEV-Protease 5-6: Waschschritte mit PBS, 7: Elutionsschritt mit 5 mM Glutathion. Fraktionen der einzelnen Isolierungsschritte der Tim9-Untereinheit: **B:** 1: Elution der Glutathionaffinitätschromatographie, 2: nach der proteolytischen Spaltung. **C:** weitere Glutathionaffinitätschromatographie der Tim9-Untereinheit, 1-4: Durchfluss der Glutathionaffinitätschromatographie, 2: Elutionsschritt mit 5 mM Glutathion.

Abbildung 4.1.2 A zeigt die einzelnen Isolierungsschritte vom Rohextrakt der Expression der Tim10-Untereinheit (Spur 1) bis zur isolierten einzelnen Untereinheit (Spur 4 und 5). Abbildung 4.1.2 B und C zeigen die Isolierungsschritte der Tim9-Untereinheit von der isolierten GST-Fusion (Spur 1, Abbildung 4.1.2 B) bis zu der isolierten einzelnen Untereinheit (Spur 2 und 3, Abbildung 4.1.2 C). Bei beiden SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen wurden äquivalente Volumen aufgetragen, sodass die Bandenintensitäten beider Reinigungen direkt miteinander vergleichbar sind. In Spur 4 und 5 Abbildung 4.1.2 A ist unterhalb der Markerbande von 14400 eine Bande zu erkennen, welche der Größe von Tim10 entsprechen würde ( $M_r$ : 11069). Zusätzlich ist oberhalb der Markerbande von 25000 eine Bande zu erkennen, welche dem GST-Anhängsel entsprechen würde ( $M_r$ : 27103). In Spur 2 und 3 Abbildung 4.1.2 C ist unterhalb der Markerbande von 14400 eine Bande zu erkennen, die der Tim9-Untereinheit entsprechen würde ( $M_r$ : 10847). Neben der Bande für das Tim9 ist jeweils oberhalb der Markerbanden von 25000 und 35000 eine Bande zu erkennen, welche dem GST-Anhängsel bzw. dem

GST-Tim9 Fusionsprotein entsprechen würde ( $M_r$ : GST = 27103, GST-Tim9 = 37932). Wie man auf den Abbildungen erkennen kann, wird von der Tim9 Untereinheit weniger lösliches Protein produziert als von der Tim10-Untereinheit. Eine Analyse der unlöslichen Fraktionen ergab, dass ein Hauptteil des GST-Tim9-Fusionsproteins als *inclusion bodies* anfällt (Daten nicht gezeigt). Die lösliche isolierte Tim9-Untereinheit aggregierte innerhalb 24 h Lagerung bei 6 °C und präzipitierte aus der Lösung.

Da beim Einsatz des Tim10/Tim9-Gerüsts die Funktionalisierung der Untereinheiten im Vordergrund steht, wurden nun in einem weiteren Schritt exploratorisch funktionalisierte Tim9-Varianten hergestellt. Als Fusionspartner wurden die cMpl-Rezeptor-bindenden Mikroproteine ET-TP-020 und AG-TP-050 ausgewählt [19]. Mikroproteine sind kleine Proteine mit ca. 34 Aminosäuren, dessen Hauptfaltungsmotif ein Cystin-Knoten ist. Die hier verwendeten Mikroproteine basieren auf den natürlichen Mikroproteinen EETI-II bzw. der c-terminale Domäne des humanen *agouti-related protein* (AGRP), wobei die aktiven Schleifen durch ein cMpl-bindendes Peptid ausgetauscht wurden (Abbildung 4.1.3).

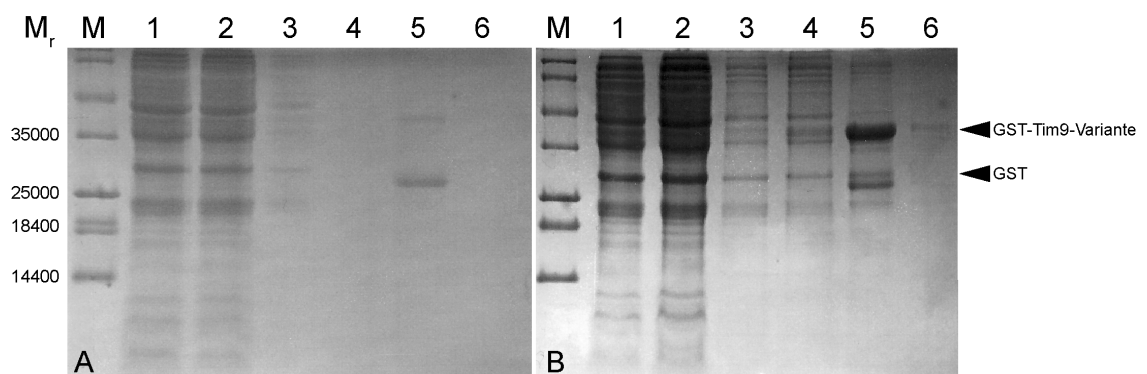


**Abbildung 4.1.3:** Schematische Darstellung der Mikroproteine EETI-II (A) und AGRP (B). Disulfidbrücken sind in gelb und  $\beta$ -Stränge in blau dargestellt. Die rot gefärbte Schleife wurde durch ein cMpl-Rezeptor-bindendes Peptid ausgetauscht. Modifiziert nach [87].

Die Mikroproteine zeigen eine hohe Affinität zum Thrombopoietinrezeptor [19] und wurden als Modellproteine ausgewählt, da ihre durch Trimerisierung hervorgerufenen Aviditätseffekte *in vitro* und *in vivo* gut untersucht werden können [88]. Die Mikroproteine wurde jeweils an das Fusionsgen aus GST und Tim9 fusioniert. Dafür wurde der Vektor pBar100-ET-TP-020 bzw. pET32a-TEV-AG-TP-050 mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *HindIII* gespalten und über ein Agarosegel gereinigt (3.2.7., 3.2.4.). Der Vektor pGex3T-Tim9C wurde analog

restrigiert und ebenfalls über ein Agarosegel gereinigt. Die gereinigten Fragmente wurden zur Ligation eingesetzt (3.2.8.). Der gesamte Ligationsansatz wurde zur Transformation elektrokompenter Zellen des Stammes *E. coli* Top 10 eingesetzt (3.1.4.). Zur Überprüfung der erfolgreichen Transformation wurde die Plasmid-DNA einzelner Klone isoliert (3.2.5.) und mit dem Enzym *ApaI* für pGex3T-Tim9ET-TP-020 bzw. *BamHI* für pGex3T-Tim9AGTP050 verdaut (3.2.7.).

Die Expression der funktionalisierten Tim9-Variante erfolgte analog zu der singulären Tim9-Untereinheit. Die einzelnen Fraktionen der Isolierung wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (3.3.8., Abbildung 4.1.4).



**Abbildung 4.1.4:** SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese funktionalisierter Tim9-Varianten. **A:** GST-Tim9-AGTP050, **B:** GST-Tim9-ET-TP-020. Jeweils M = Fermentas® *Molecular Weight Marker*, Spur 1: Rohextrakt, Spur 2: Durchlauf, Spur 3: Waschschrift mit PBS, Spur 4-6: Elutionsschritte mit 5 mM reduziertem Glutathion.

Bei der Elutionsfraktion auf Spur 5 (Abbildung 4.1.4 A und B) konnten insgesamt zwei Banden detektiert werden. Eine Bande zwischen den Markerbanden von 35000 und 45000 und eine Bande oberhalb der Markerbande von 25000. Dies würde den Größen der gewünschten Fusionsproteine (GST-Tim9-ET-TP-020: 41640,73 und GST-Tim9-AG-TP-050: 41401,68) und dem GST (27102,99) entsprechen. Um die Menge an gereinigten Fusionsprotein zu bestimmen, wurden die proteinhaltigen Fraktionen gegen PBS dialysiert. Für die Dialyse wurde ein Dialysierschlauch mit einer molekularen Ausschlussgrenze (MWCO: *molecular weight cut off*) von 14000 verwendet. Bei der Dialyse aggregierten die Fusionsproteine und wurden unlöslich. Eine Bestimmung der Gesamtausbeute funktionalisierter Tim9-Untereinheiten war somit nicht möglich. Eine Übersicht über die Gesamtausbeuten, welche ermittelt werden konnten, ist in Tabelle 4.1.1 zusammengefasst.

**Tabelle 4.1.1:** Übersicht über die Ausbeute an gereinigten Tim-Untereinheiten.

Untereinheit	Molekulargewicht	Ausbeute (mg) <sup>a</sup>
GST-Tim9	37940	1,5
GST-Tim10	38172	6,8
Tim9	10847	-
Tim10	11069	1,6
GST-Tim9-AGTP050	41402	-
GST-Tim9-ET-TP-020	41641	-

a: Die Ausbeute bezieht sich auf je 1 L Kulturmedium, normiert auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5.

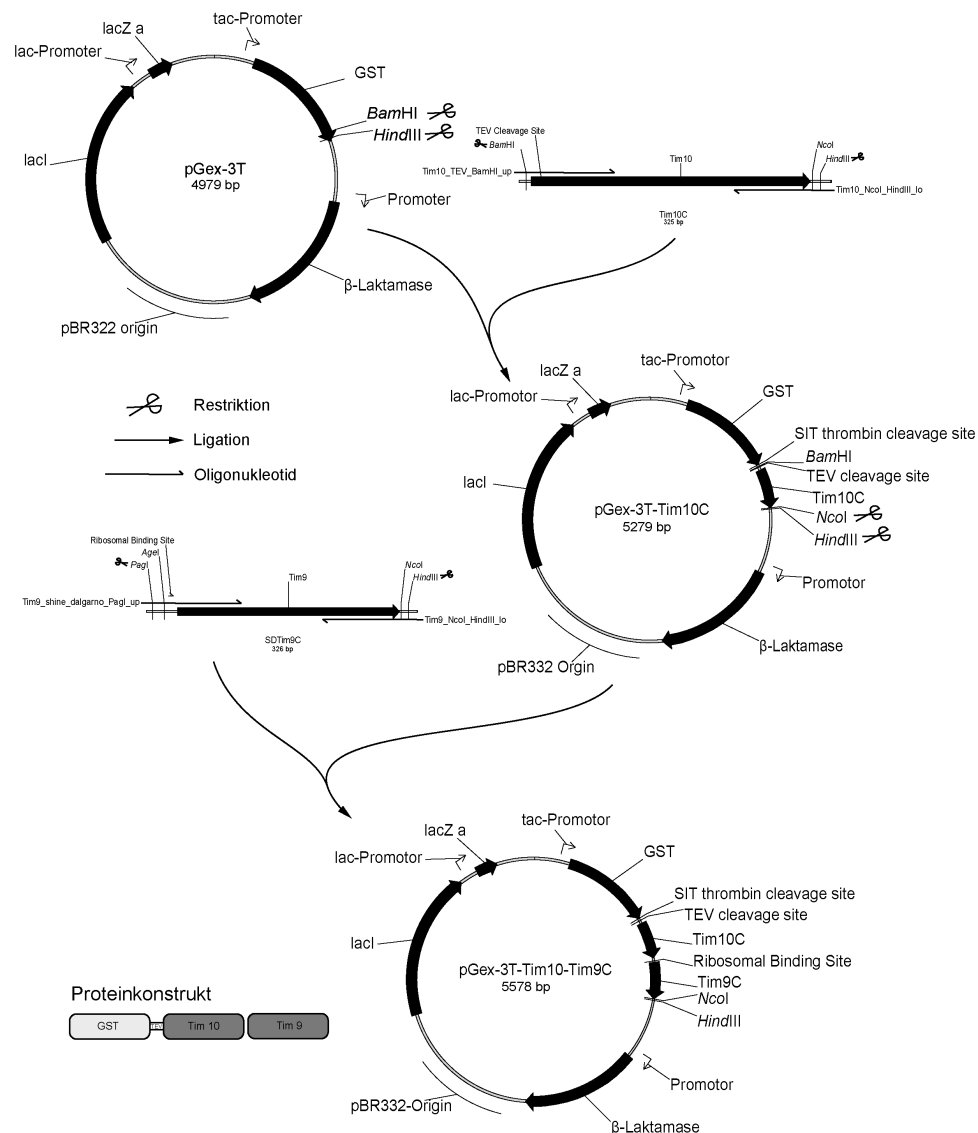
-: Proteinkonzentration nicht messbar, da das Protein aggregiert ist.

Die ermittelten Mengen wurden auf eine optische Dichte bei  $\lambda=600$  nm von 0,5 der eingesetzten Zellkultur normiert. Von dem GST-Tim10-Fusionsprotein konnte im Durchschnitt eine 4,7-fach höhere Ausbeute erzielt werden, als von dem GST-Tim9-Fusionsprotein. Die Isolierung einer solitären Tim9-Untereinheit in löslicher Form war nicht möglich, da die Untereinheit bei der Dialyse gegen einen physiologischen Puffer präzipitierte. Die funktionalisierten Varianten präzipitieren schon als Fusionsprotein, so dass keine Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgen konnte. Auch eine Expression der Tim9-Untereinheit als Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindeprotein, dem Thioredoxin und der  $\beta$ -Laktamase erbrachte kein lösliches Protein in ausreichender Menge (Daten nicht gezeigt). Eine Expression solitärer Tim9 und Tim10-Untereinheiten wäre somit nur durch Rückfaltung degradiert Tim9-Untereinheiten möglich. Da die Bedingung zur Renaturierung direkt von der verwendeten Proteinsequenz abhängt und somit erst für jede der geplanten Varianten optimiert werden müsste, wurde im weiteren von einer singulären Produktion abgesehen. Luciano und Kollegen haben ein bicistronisches Expressionssystem beschrieben, welches Tim10/Tim9-Komplex mit einem GST-Tim10-Fusionsprotein und einem Tim9 getrennt durch eine ribosomale Bindestelle in ausreichender Menge zur Verfügung stellt [89]. Auf diesen Grundlagen wurde analog ein bicistronisches Expressionssystem aufgebaut.

### 4.1.2. Untersuchungen zur bicistronischen Expression funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe

Bei der bicistronischen Expression liegen die Untereinheiten des Tim10/Tim9-Komplexes getrennt von einer ribosomalen Bindestelle auf einem Operon. In diesem Fall wurde die Tim10-Untereinheit als Fusionsprotein mit GST geplant. Als Shine-Dalgarno-Sequenz wurde die bei Skerra und Kollegen publizierte ribosomale

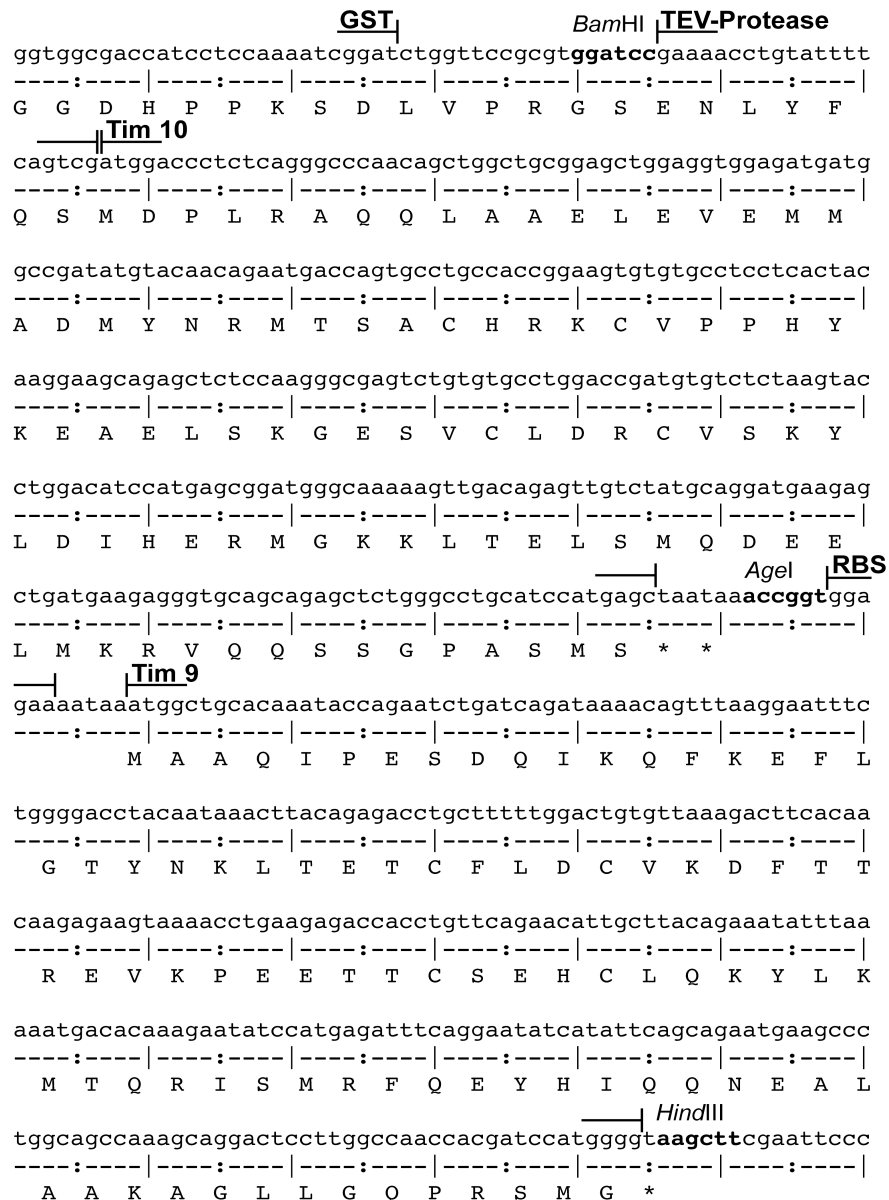
Bindestelle zur rekombinanten Produktion von Antikörperfragmenten in einer modifizierten Form verwendet [90]. Die Verwendung dieser Shine-Dalgarno-Sequenz bot sich an, da eine spätere Modifizierung mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen möglich ist. Ein Schema der Klonierung ist in Abbildung 4.1.5 dargestellt. Eine Übersicht über den geplanten Sequenzkontext ist in Abbildung 4.1.6 dargestellt.



**Abbildung 4.1.5:** Schematische Darstellung der Klonierung des Vektors pGex3T-Tim10-Tim9C.

Für die Klonierung wurde zunächst das Tim10-Gen mit den Oligonukleotiden Tim10\_Tev\_BamHI\_up und Tim10\_NcoI\_HindIII\_lo amplifiziert (3.2.9.) und mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III restrigiert (3.2.7.). Der Vektor pGex3T wurde analog restrigiert und über ein Agarose Gel gereinigt (3.2.4.). Die so vorbereiteten Edukte wurden zur Ligation eingesetzt (3.2.8.) und

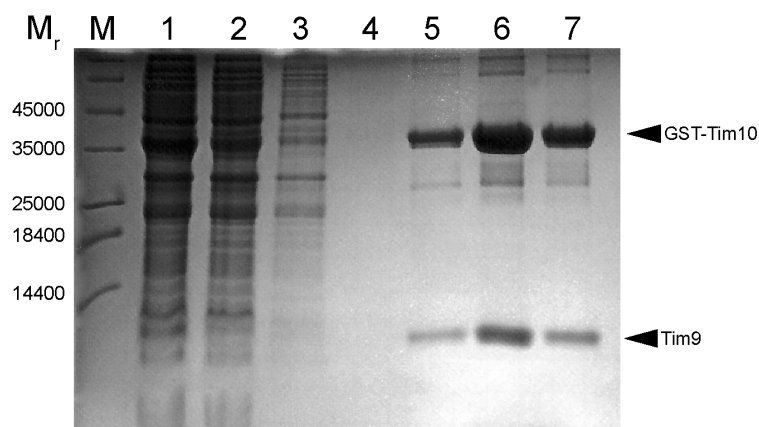
elektrokompetente Zellen des Stamms *E. coli* Top 10 mit dem Ligationsansatz transformiert (3.1.4.). Die Analyse der Transformation erfolgte analog zu der des Vektors pGex-3T-Tim10N. Die Sequenz der vermeintlich positiven Klon wurde durch Sequenzanalyse, unter Verwendung des Oligonukleotids GST-Seq-up überprüft. Für die Klonierung des Tim9-Gens mit der Shine-Dalgarno-Sequenz wurde zunächst das Tim9-Gen mit den Oligonukleotiden Tim9\_shine\_dalgarno\_PagI\_up und Tim9\_NcoI\_HindIII\_lo amplifiziert (3.2.9.).



**Abbildung 4.1.6:** Sequenzkontext der bicistronischen Expression. GST: Glutathion-S-Transferase, TEV-Protease: Erkennungssequenz der TEV-Protease, RBS: ribosomale Bindestelle. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsschnittstellen sind in der DNA-Sequenz hervorgehoben.

Mit den Oligonukleotiden wurde am 5'-Ende des Leitstrangs eine Shine-Dalgarno-Sequenz und die für die Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen eingefügt. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit den Enzymen *PagI* und *HindIII* restrigiert (3.2.7.). Der Akzeptorvektor pGex-3T-Tim10C wurde mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *HindIII* restrigiert und das Vektorrückrat über ein Agarosegel gereinigt (3.2.7.;3.2.4.). Die so vorbereiteten Edukte wurde zur Ligation eingesetzt (3.2.8.). Elektrokompente Zellen des Stamms *E. coli* Top 10 wurden mit dem gesamten Ligationsansatz transformiert (3.1.4.). Die Analyse einzelner Klone erfolgte durch Restriktionsspaltung (3.2.7.). Vermeintlich positiven Klone wurden durch Sequenzanalyse unter Verwendung des Oligonukleotids GST-Seq-up überprüft.

Die Expression des Konstrukts erfolgte in je 1L komplettiertem LB-Medium in *E. coli* des Typs Origami (DE3) pLysS (3.3.2.). Der Zellaufschluss erfolgte durch French *pressing* (3.3.4.) und unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation separiert (Sigma 3K30, Rotor 12158 H, 15000 Upm, 4°C, 20 min). Der Tim10/Tim9-Komplex wurde durch eine Glutathion-Affinitätschromatographie aus dem Rohextrakt isoliert. Die Fraktionen wurden auf einem 20 %igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert (3.3.8, Abbildung 4.1.7). Die Spuren 5-7 auf Abbildung 4.1.7 weisen jeweils zwei Banden auf, die den erwarteten Größen des GST-Tim10-Fusionsproteins (38028) und der Tim9-Untereinheit (10760) entsprechen.



**Abbildung 4.1.7:** SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese des bicistronisch exprimierten GSTTim10 Tim9. M = Fermentas® *Molecular Weight Marker*, 1: Rohextrakt, 2: Durchfluss, 3: Waschschritt mit PBS, 4-7: Elutionsschritte.



Für weitere Analysen wurden funktionalisierte Varianten des Tim10/Tim9-Komplexes hergestellt. Eine Übersicht über die Varianten zur Analyse der bicistronischen Expression ist in Tabelle 4.1.2 dargestellt. Zur Detektion der Tim9-Untereinheit wurde eine Variante mit *cMyc-tag* C-terminal an der Tim9-Untereinheit generiert. Für die Detektion dieses cMyc-Anhängsels steht ein monoklonaler Antikörper zur Verfügung. Weiterhin wurde eine Variante mit dem oben beschriebenen Mikroprotein ET-TP-020 hergestellt. Die Klonierung der cMyc-Variante erfolgte analog zu der Klonierung der nativen Tim9-Variante. Zur Inkorporation des cMyc-Peptids wurde das Oligonukleotid Tim9\_cMyc\_Hind\_lo an Stelle des Oligonukleotids Tim9\_NcoI\_HindIII\_lo verwendet.

**Tabelle 4.1.2:** Varianten zur Analyse der bicistronischen Expression.

Plasmid	Peptid Sequenz <sup>a</sup> / M <sub>r</sub> <sup>b</sup>	Ausbeute <sup>c</sup> (mg)
pGex-3T-Tim10-Tim9	PRSMG*/10762	2,1
pGex-3T-Tim10-Tim9cMyc	PRSMEQKLISEENL*/11889	4,4
pGex-3T-Tim10-Tim9ET-TP-020	PRSMGCIEGPTLRQWLAARACKQ DSDCLAGCVCGPNGFCGS* /14472	1,9

<sup>a</sup> C-terminale Sequenzen der Tim9-Untereinheit. Modifikationen der Tim9-Untereinheit sind hervorgehoben.

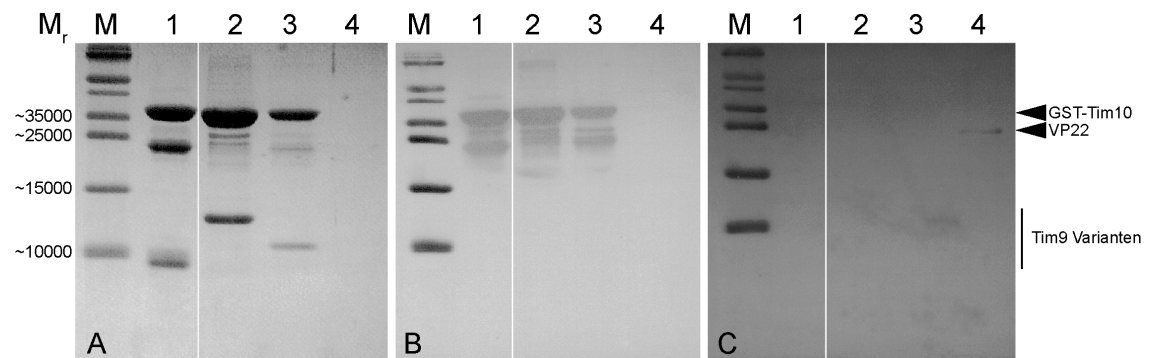
<sup>b</sup> Molekulargewicht der funktionalisierten Tim9-Untereinheit, M<sub>r</sub> GST-Tim10-Untereinheit: 38029,6

<sup>c</sup> Die Ausbeute bezieht sich auf je 1 L Kulturmedium, normiert auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5.

Für die Variante pGex-3T-Tim10-Tim9-ET-TP-020 wurde der Vektor pGex-3T-Tim10-Tim9C mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *HindIII* restrigiert (3.2.7.) und das Vektorrückrad über ein Agarosegel gereinigt (3.2.4.). Für die Ligation wurde das oben beschriebene ET-TP-020-Fragment verwendet (3.2.8.). Elektrokompente Zellen des Stamms *E. coli* Top 10 wurden mit dem Ligationsansatz transformiert (3.1.4.). Zur Analyse einzelner Klone wurde die Plasmid-DNA isoliert (3.2.5.) und mit dem Restriktionsenzym *BglII* restrigiert (3.2.7.).

Die Expression und Isolierung der funktionalisierten Varianten erfolgte analog zum nativen Komplex. Fraktionen der Glutathion-Affinitätschromatographie, welche das gewünschte Protein beinhalteten, wurden vereint und über Nacht gegen PBS dialysiert. Für die Dialyse wurde ein Dialysierschlauch mit einer MWCO von 14000 verwendet. Die Gesamtausbeuten der jeweiligen funktionalisierten Varianten und des nativen Komplexes sind in Tabelle 4.1.2 aufgeführt. Die

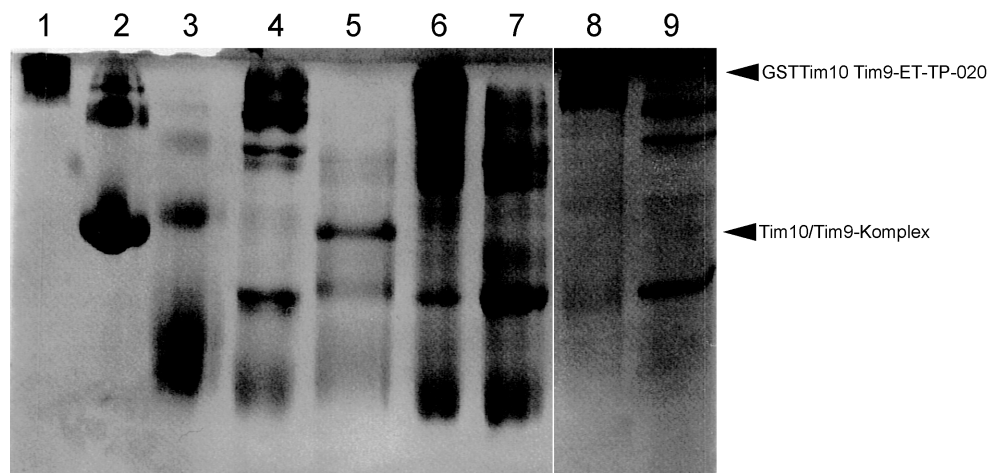
Ausbeuten der verschiedenen Varianten liegen zwischen 1,9 und 4,4 mg bezogen auf 1 L Kulturmedium, normiert auf eine optische Dichte von 0,5 bei  $\lambda=600$  nm. Zum Nachweis der einzelnen Untereinheiten wurde ein Western-Blot durchgeführt (3.3.10., Abbildung 4.1.8). Die Detektion der Tim10-Untereinheit erfolgte indirekt über die Detektion der fusionierten Glutathion-S-Transferase mit einem gegen diesen gerichteten spezifischen Antikörper. Die Detektion der Tim9-Untereinheit erfolgte ebenfalls indirekt über die Verwendung eines cMyc-tag spezifischen Antikörpers. Als Positivkontrolle für die Detektion des cMyc-tags wurde das Protein VP22-cMyc verwendet, welches freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Friedl, TU Darmstadt zur Verfügung gestellt wurde. Abbildung 4.1.8 zeigt die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (A), die Detektion der Glutathion-S-Transferase (B) und die Detektion des cMyc-tags (C).



**Abbildung 4.1.8:** Western Blot Analyse der GSTTim10 Tim9 Varianten. M = Fermentas® PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 1: GSTTim10 Tim9c, 2: GSTTim10 Tim9-ET-TP-020, 3: GSTTim10 Tim9cMyc, 4: VP22 Positivkontrolle zur Detektion des cMyc-tag- **A:** SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese gefärbt mit Coomassie. **B:** Detektion mit  $\alpha$ -GST Antikörper, **C:** Detektion mit  $\alpha$ -cMyc Antikörper.

Wie auf Abbildung 4.1.8 A zu erkennen ist, konnten bei allen drei Varianten mehrere Banden bei einem Molekulargewicht von 25000 und 35000 und je eine Bande zwischen 10000 und 15000 detektiert werden. Diese Banden entsprechen dem Molekulargewicht des GSTs, des GST-Tim10-Fusionsproteins und der unterschiedlichen Tim9-Varianten. Bei der Detektion der Glutathion-S-Transferase konnte bei allen drei Varianten die Banden entsprechend der GST und des GST-Tim10-Fusionsproteins detektiert werden. Die Detektion des cMyc-tags ergab wie erwartet nur bei der cMyc-Variante und der Positivkontrolle eine entsprechende Bande. Somit konnte sowohl indirekt die Tim10-Untereinheit als auch die Tim9-Untereinheit in den erwarteten Molekulargewichtsbereichen nachgewiesen werden. Alle Varianten konnten ohne zu aggregieren gegen PBS dialysiert und

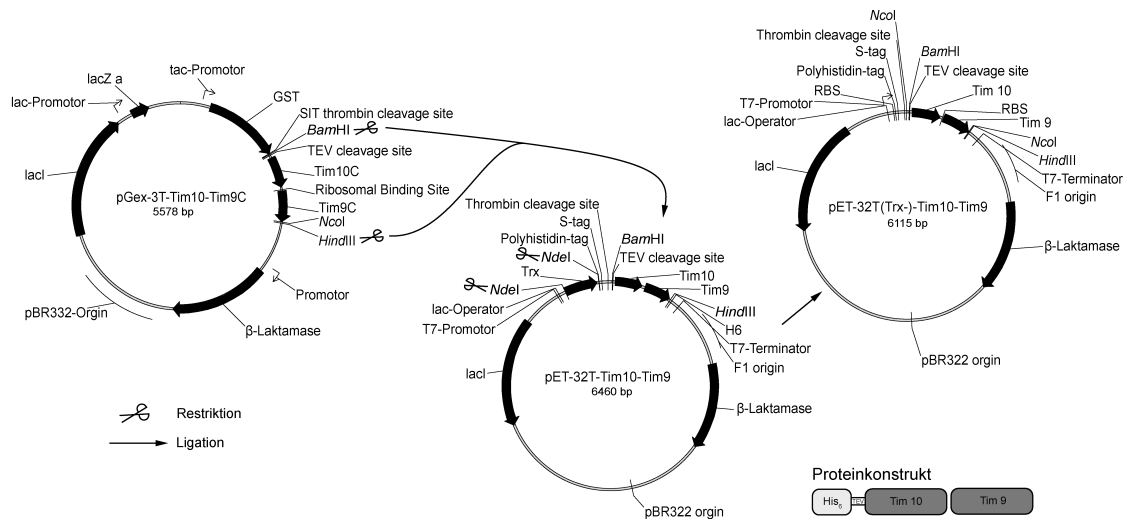
über einen längeren Zeitraum bei 4 °C gelagert werden (Daten nicht gezeigt). Weiterführend wurde nun die Oligomerisierung des Tim10/Tim9-Komplexes als GST-Fusion analysiert. Dafür wurden mit den oben beschriebenen Varianten eine Blau-Native-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) durchgeführt (3.3.9., Abbildung 4.1.9). Neben den erwähnten Varianten wurde auch ein solitär produziertes GSTTim10-Fusionsprotein mitgeführt. Zudem wurden die Varianten GSTTim10 Tim9 und GSTTim10 zusätzlich mit der TEV-Protease verdaut (3.3.7.) und ebenfalls durch BN-PAGE untersucht (3.3.9., Abbildung 4.1.9).



**Abbildung 4.1.9:** BN-PAGE der GST-Tim10 Tim9 Varianten. 1:  $\gamma$ -Globulin aus dem Schwein ( $M_r$ : 158000), 2: Rinderalbumin ( $M_r$ : 66200), 3: Albumin aus Hühnereiweiß ( $M_r$ : 45000), 4: GSTTim10 Tim9, 5: GSTTim10 Tim9 nach proteolytischem Verdau mit TEV-Protease, 6: GSTTim10, 7: GSTTim10 nach proteolytischem Verdau mit TEV-Protease, 8: GSTTim10 Tim9ET-TP-020, 9: GSTTim10 Tim9cMyc.

Auf den ersten drei Spuren der BN-PAGE auf Abbildung 4.1.9 sind die Vergleichsproteine bekannter Größe aufgetragen. Bei den Vergleichsproteinen handelt es sich um Albumine und Globuline, welche sich durch ihre globuläre Form als einheitlicher Vergleichsstandard eignen, jedoch zur Bildung von Di- und unspezifischen Multimeren neigen. Daher wird zum Vergleich nur die jeweils unterste Bande verwendet. Die proteolytisch gespaltene Variante GSTTim10 Tim9 (Spur 5, Tim10/Tim9-Komplex) und die Variante GSTTim10 Tim9-ET-TP-020 (Spur 8) zeigen spezifische Banden in der erwarteten Größe. Alle anderen Proben, insbesondere die solitär produzierte Variante GSTTim10 (Spur 6), zeigen mehrere Banden und verschmiertes Protein. Dies deutet auf eine Aggregation der Proteine durch das GST hin. Daher wurde in einem nächsten Schritt Varianten ohne N-terminale Glutathion-S-Transferase hergestellt.

Für die Klonierung der Variante ohne N-terminale Glutathion-S-Transferase wurde der Vektor pET32T verwendet. Dieser Vektor ermöglicht, nach einem einfachen Umklonierungsschritt des Tim10-Tim9-Operons aus dem pGex3T-Vektors und der Deletion des Thioredoxin-Gens, eine Expression des Tim10/Tim9-Komplexes mit N-terminalen His-tag an der Tim10-Untereinheit. Ein Schema der Klonierung ist in Abbildung 4.1.10 dargestellt.

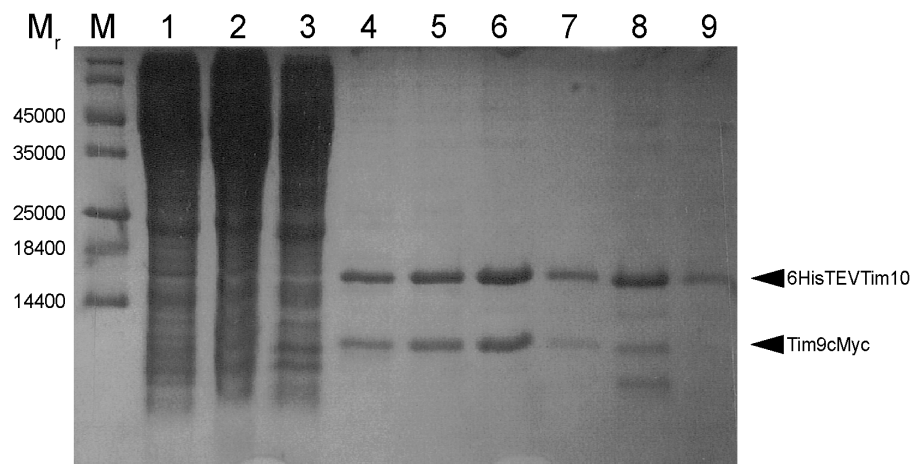


**Abbildung 4.1.10:** Klonierungsschema zur Herstellung des Vektors pET-32T(Trx-)-Tim10-Tim9.

Für die Klonierung wurden die Vektoren pGex-3T-Tim10-Tim9C und pET-32T mit den Enzymen *Bam*HI und *Hind*III restrigiert (3.2.7.). Die gewünschten Fragmente wurden über ein Agarose-Gel gereinigt (3.2.4.). Die so vorbereiteten Edukte wurde zur Ligation eingesetzt (3.2.8.). Elektrokompente Zellen des Stamms *E. coli* Top 10 wurden mit dem Ligationsansatz transformiert (3.1.4.). Zur Analyse der Transformanten wurde die Plasmid-DNA einzelner Klone isoliert (3.2.5.) und mit dem Enzym *Nco*I restrigiert (3.2.7.). Der so konstruierte Vektor pET-32T-Tim10-Tim9C wurde zur Deletion des Thioredoxin-Gens mit dem Enzym *Nde*I restrigiert und das Vektorrückrad über ein Agarosegel gereinigt. Der so vorbereitete Vektor wurde zur Ligation eingesetzt (3.2.8.). Elektrokompente Zellen des Stamms *E. coli* Top 10 wurde mit dem gesamten Ansatz transformiert (3.1.4.). Zur Analyse der Transformanten wurde die Plasmid-DNA einzelner Klone isoliert (3.2.5.) und mit dem Enzym *Nde*I restrigiert (3.2.7.). Analog zu dieser Klonierung wurde eine Variante mit C-terminalen cMyc-tag an der Tim9-Untereinheit hergestellt. Als Ausgangsvektor wurde pGex-3T-Tim10-Tim9cMyc verwendet.

#### 4. Ergebnisse

Die Expression erfolgte analog zur Variante mit GST-*tag* in 1L LB-Medium (3.3.2.). Der Zellaufschluss erfolgte durch French-*pressing* (3.3.4.). Der Tim10/Tim9-Komplex wurde durch Nickelaffinitätschromatographie aus dem Rohextrakt isoliert (3.4.2.). Zur Analyse der Fraktionen wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt (3.3.8., Abbildung 4.1.11).



**Abbildung 4.1.10:** SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der Fraktionen der Nickelaffinitätschromatographie der Variante Tim10/Tim9cMyc. M: Fermentas® *Molecular Weight Marker*, Spur 1: Rohextrakt, Spur 2: Durchfluss, Spur 3: Waschschrift mit IMAC A-Puffer, Spuren 4-9: Elutionsschritte mit 60, 80, 120, 160, 200 und 500 mM Imidazol.

Abbildung 4.1.11 zeigt die Isolierung eines mit einem cMyc-*tag* funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexes aus dem Rohextrakt. In jeder Elutionsfraktion mit Imidazol konnten Proteine auf der Höhe der Tim10-Untereinheit mit Polyhistidin-*tag* und Linkersequenz (6HisTEVTim10,  $M_r$ : 16392) und der Tim9-Untereinheit mit cMyc-*tag* (Tim9cMyc,  $M_r$ : 11887) nachgewiesen werden. Eine Übersicht der Gesamtausbeuten einzelner Varianten ist in Tabelle 4.1.3 zusammengefasst.

**Tabelle 4.1.3:** Ausbeuten der Varianten 6HTim10 Tim9.

Plasmid	Peptidsequenz <sup>a</sup> / $M_r$ <sup>b</sup>	Ausbeute <sup>c</sup> (mg)
pET32T(Trx-)-Tim10-Tim9	PRSMG*/10762	1.8
pET32T(Trx-)-Tim10-Tim9cMyc	PRSMEQKLISEENL*/11889	1.7

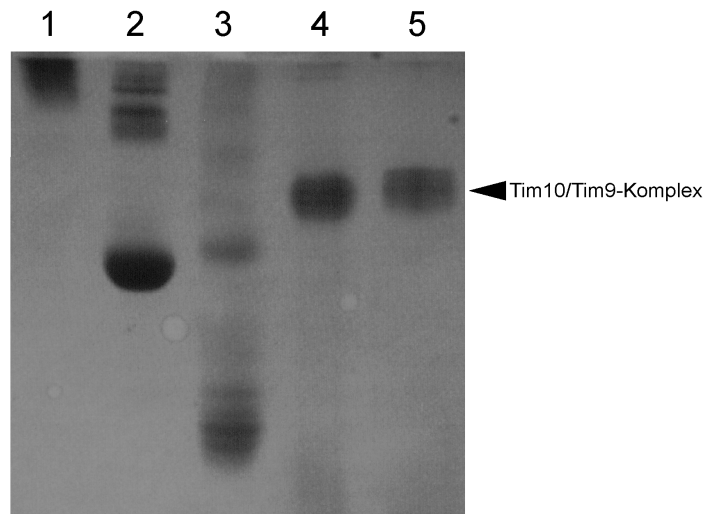
<sup>a</sup>: C-terminale Aminosäuresequenz der Tim9-Untereinheit, zur nativen Untereinheit veränderte Aminosäuren sind hervorgehoben

<sup>b</sup> Molekulargewicht der funktionalisierten Tim9-Untereinheit,  $M_r$  6His-Tim10-Untereinheit: 16394,31

<sup>c</sup>: Die Ausbeute bezieht sich auf je 1 L Kulturmedium, normiert auf eine  $OD_{600}$  von 0,5.

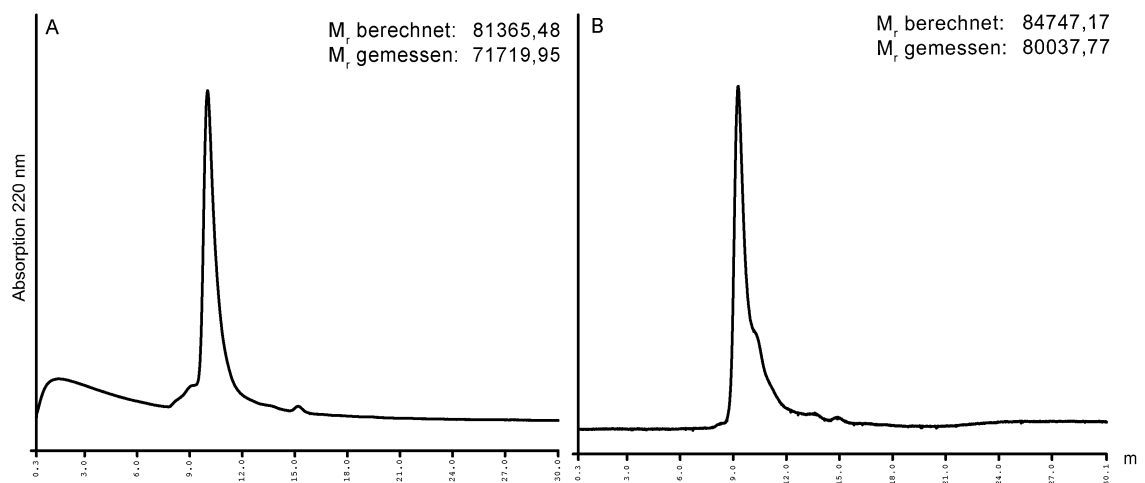
Die Expression lag auf einem vergleichbaren Niveau wie bei der bicistronischen Expression als GST-Fusion. Zur Untersuchung der Oligomerisierungsfähigkeit

funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe wurde zunächst eine BN-PAGE durchgeführt (3.3.9., Abbildung 4.1.12)



**Abbildung 4.1.12:** BN-PAGE der Tim10/Tim9-Komplex Varianten. 1:  $\gamma$ -Globulin aus dem Schwein ( $M_r$ : 58000), 2: Rinderserumalbumin ( $M_r$ : 66200), 3: Albumin aus Hühnereiweiß ( $M_r$ : 45000), 4: Tim10/Tim9, 5: Tim10/Tim9cMyc.

Beide Varianten bilden auf der BN-PAGE eine singuläre Bande aus. Diese Bande konnte zwischen den Vergleichsproben des monomeren BSAs und des  $\gamma$ -Globulins gefunden werden. Dies zeigt an, dass ein hexamerer Tim10/Tim9-Komplex gebildet wurde. Neben dem Laufverhalten auf einem blau-nativen Polyacrylamidgel wurden die Varianten zusätzlich durch analytische Gelfiltrationschromatographie überprüft (3.4.3., Abbildung 4.1.13).



**Abbildung 4.1.13:** Analytische Gelfiltrationschromatographie der Varianten Tim10/Tim9 (A) und Tim10/Tim9cMyc (B). Die Chromatogramme zeigen die Optische Dichte bei  $\lambda = 220$  nm in Abhängigkeit der Zeit. Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit den Proteinen  $\gamma$ -Globulin (Schwein), Rinderserumalbumin, Ovalbumin und Lysozym (Hühnereiweiß).

Die analytische Gelfiltrationschromatographie zeigte bei beiden Varianten je einen Hauptpeak bei einer Retentionszeit von 9,28 (Tim10/Tim9cMyc) und 10,02 (Tim10/Tim9) Minuten. Diese Retentionszeiten entsprechen einem theoretischen Molekulargewicht von 71700 (Tim10/Tim9,  $M_r$ : 81366) bzw. 80040 (Tim10/Tim9cMyc,  $M_r$ : 84747), welches annähernd den erwarteten Größen eines heterooligomeren Komplexes entspricht. Die bicistronische Expression stellt somit ein stabiles Expressionssystem zur Bereitstellung funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe dar.

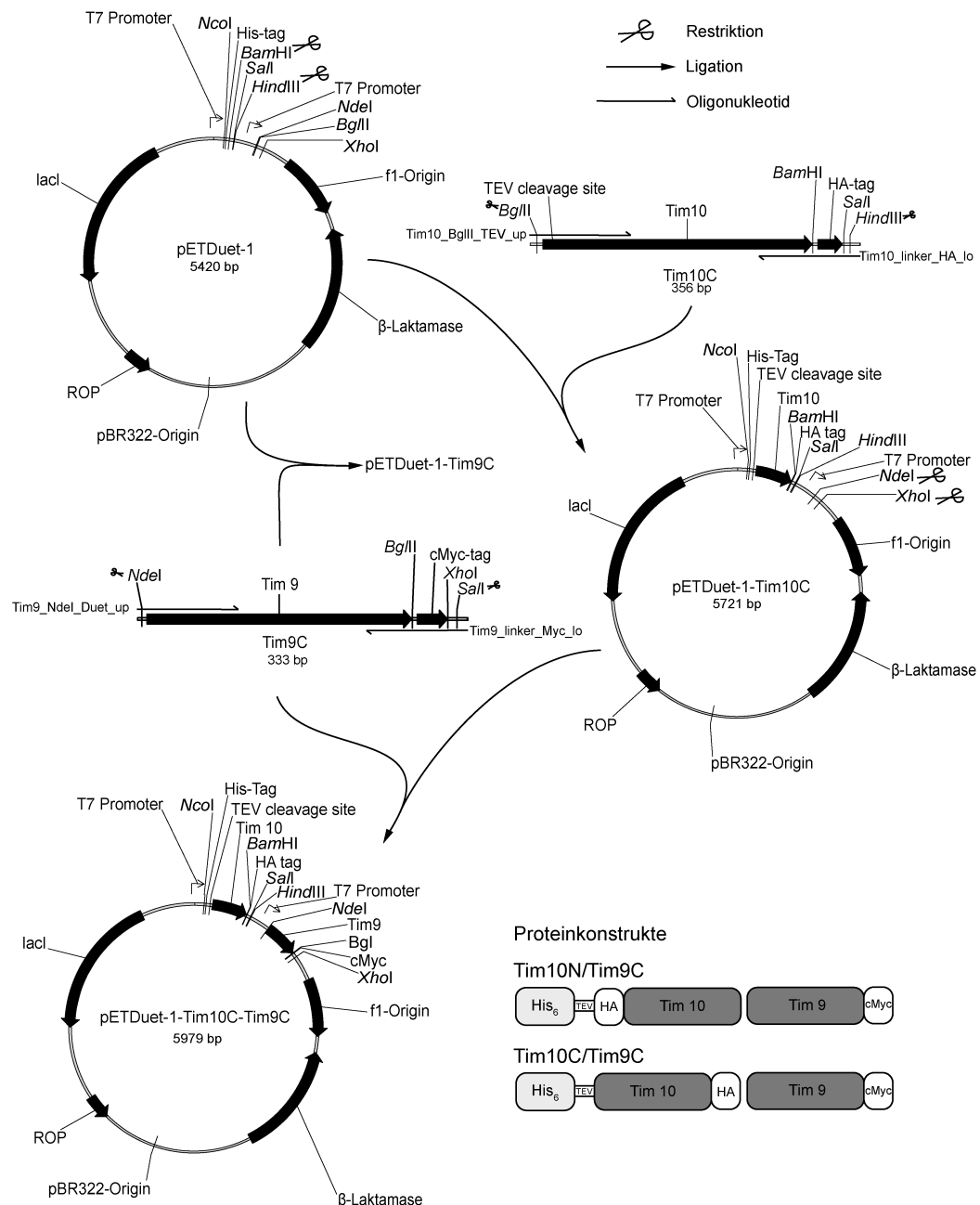
Aufgrund der umständlichen Klonierung der hier gezeigten Varianten, wurde im nächsten Schritt ein kommerzielles duales Expressionssystem verwendet, welches die Expression der beiden Untereinheiten durch je einen eigenen Promotor auf einem Vektor ermöglicht. Der hier eingesetzte Vektor pETDuet1 wurde freundlicherweise von Dr. Björn Hock (Merck KGaA, Darmstadt) zur Verfügung gestellt.

##### 4.1.3. Untersuchungen zur dualen Expression funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe

Der Vektor pETDuet1 ermöglicht die simultane Expression zweier Gene auf einem Vektor unter der Kontrolle je eines T7-Promotors. Dabei bietet er die Möglichkeit eines der Gene mit einem Polyhistidin-*tag* zu fusionieren. Um ein möglichst einfaches System zur Bereitstellung verschiedener funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe zu erstellen, wurden zwei verschiedene Vektoren hergestellt. Beiden Vektoren gemein ist die Möglichkeit, Peptide und Proteine C-terminal an die Tim9-Untereinheit zu fusionieren. Ein Vektor ermöglicht eine N-terminale (pETDuet-1-Tim10N-Tim9C) und der andere Vektor eine C-terminale Fusion (pETDuet-1-Tim10C-Tim9C) an die Tim10-Untereinheit. In jedem Fall wird die Tim10-Untereinheit mit einem Polyhistidin-*tag* versehen. Ein Schema für die geplante Klonierung am Beispiel des Vektors pETDuet-1-Tim10C-Tim9C ist in Abbildung 4.1.14 dargestellt. Durch die Verwendung zueinander kompatibler Restriktionsschnittstellen ist eine einfache Umklonierung von Genkonstrukten möglich. Als Platzhalter und für weitere Untersuchungen wurde beim Gen der Tim10-Untereinheit ein Hemagglutininepitop aus dem Influenzavirus (*HA-tag*), gegen den ein monoklonaler Antikörper zur Verfügung steht, und beim Gen der

## 4. Ergebnisse

Tim9-Untereinheit ein cMyc-tag fusioniert. Für die Klonierung wurde zunächst das Tim10-Gen mit den Oligonukleotiden Tim10\_BglII\_TEV\_up und Tim10\_linker\_HA\_lo amplifiziert (3.2.9.).



**Abbildung 4.1.14:** Klonierungsschema der Vektoren pETDuet-1-Tim10C, pETDuet-1-Tim9C und pETDuet-1-Tim10C-Tim9C. His<sub>6</sub>: Polyhisidin-tag, HA: HA-Epitop, cMyc: cMyc-Epitop.

Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II und *Hind*III restrigiert (3.2.7.). Der Vektor pETDuet-1 wurde analog restrigiert und beide Fragmente wurden über ein Agarosegel gereinigt (3.2.4.). Die so vorbereiteten Edukte wurden zur Ligation eingesetzt (3.2.8.). Elektrokompente Zellen des Stamms *E. coli* Top 10 wurden hergestellt und mit dem Ligationsansatz transformiert (3.1.4.). Die

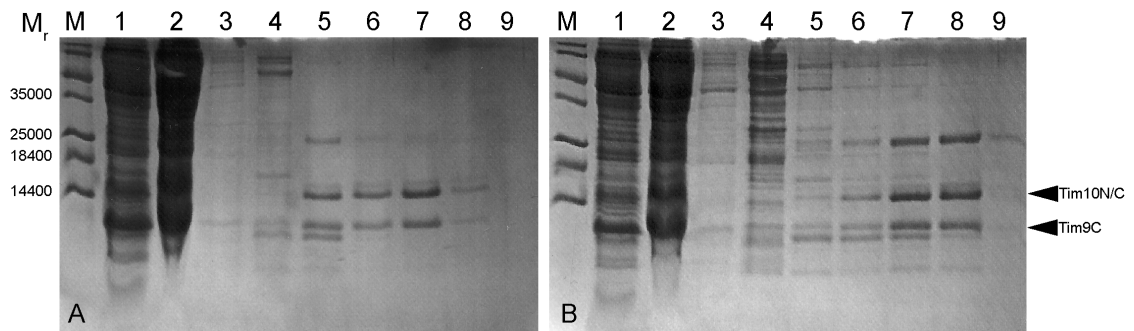


Plasmid-DNA einzelner Klone wurde isoliert (3.2.5.) und zur Analyse der Klonierung mit den Enzymen *NcoI* und *HindIII* restrigiert (3.2.7.). Die Sequenz der vermeintlich positiven Klone wurde durch Sequenzanalyse, unter Verwendung des Oligonukleotids T7prom-Bsu15I-up überprüft. Für die Klonierung des Tim9-Gens wurde zunächst das entsprechende Gen mit den Oligonukleotiden Tim9\_NdeI\_Duet\_up und Tim9\_linker\_Myc\_lo amplifiziert (3.2.9.). Mit den Oligonukleotiden wurde am 3'-Ende des Leitstrangs das Gen des cMyc-tags und die für die Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen eingefügt. Das PCR-Produkt wurde mit den Enzymen *NdeI* und *Sall* restrigiert (3.2.7.). Der Akzeptorvektor pETDuet-1-Tim10C wurde mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* restrigiert (3.2.7.) und über ein Agarosegel gereinigt (3.2.4.). Die so vorbereiteten Edukte wurde zur Ligation eingesetzt (3.2.8.). Elektrokompente Zellen des Stamms *E. coli* Top 10 wurden mit dem gesamten Ansatz transformiert (3.1.4.). Die Überprüfung einzelner Klone erfolgte durch Restriktion mit den Enzymen *NcoI* und *XhoI* (3.2.7.). Die Sequenz der vermeintlich positiven Klone wurde unter Verwendung des Oligonukleotids T7-Terminator\_pET1 durch Sequenzierung überprüft. Die Klonierung des Vektors pETDuet-1-Tim10N-Tim9C erfolgte analog mit den Oligonukleotiden Tim10\_TEV\_linker\_HA\_up1, Tim10\_TEV\_linker\_HA\_up2 und Tim10\_ClaI\_HindIII\_lo zur Amplifikation des Tim10-Gens (3.2.9.).

Die Expression der Tim10/Tim9-Komplexe erfolgte in *E. coli* des Stamms SHuffle T7 in je 1 L LB<sub>Amp</sub>-Medium (3.3.3.). Das Produkt der Expression des Vektors pETDuet-1-Tim10N-Tim9C wird im Weiteren als Tim10N/Tim9C benannt und das Produkt der Expression des Vektors pETDuet-1-Tim10C-Tim9C als Tim10C/Tim9C. Der Zellaufschluss erfolgte durch French-pressing (3.3.4.). Die funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe wurden durch eine Nickel-Affinitätschromatographie aus der löslichen Fraktion des Rohextraktes isoliert (3.4.2.). Jede Fraktion der Nickel-Affinitätschromatographie wurde zur Kontrolle auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (3.3.8., Abbildung 4.1.15 A + B). In den Elutionsschritten mit 60 - 200 mM Imidazol konnten Proteine auf der erwarteten Höhe der funktionalisierten Tim10- und Tim9-Untereinheit nachgewiesen werden (Tabelle 4.1.4). Da die Fraktionen, welche das gewünschte Protein enthielten auf dem SDS-Polyacrylamidgel noch Verunreinigungen aufwiesen, wurden diese

#### 4. Ergebnisse

konzentriert (3.3.5., MWCO: 30000) und mittels Gelfiltrationschromatographie präparativ gereinigt (3.4.3., Abbildung 4.1.16 A).



**Abbildung 4.1.15:** IMAC der Varianten Tim10N/Tim9C (A) und Tim10C/Tim9C (B). M: Fermentas® *Molecular Weight Marker*, Spur 1: Rohextrakt, Spur 2: Durchfluss, Spur 3: Waschschrift mit IMAC A-Puffer, Spuren 4-9: Elutionsschritte mit 20, 60, 100, 120, 200 und 500 mM Imidazol.

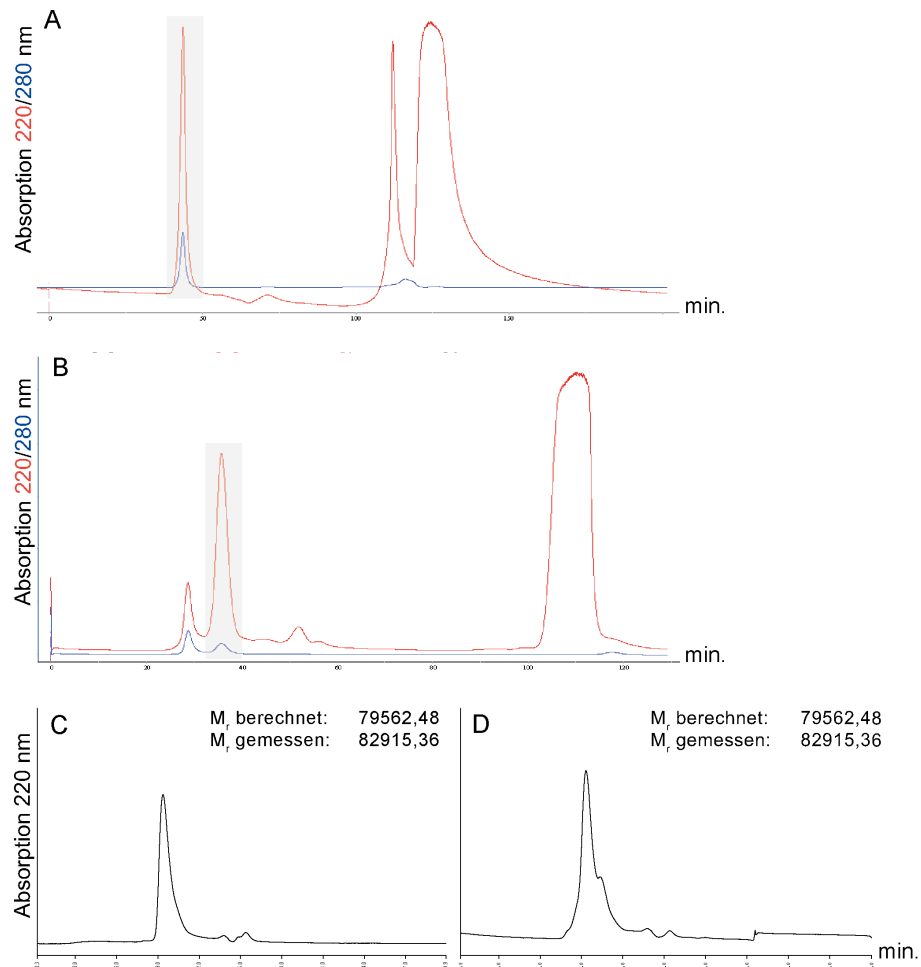
Für die Variante Tim10N/Tim9C wurde eine Sephadex G-75-Säule verwendet. Auf Grund von stärkeren Verunreinigungen wurde für die Variante Tim10C/Tim9C eine Sephadex G-200 Säule verwendet, welche im Bereich bei einem Molekulargewicht von ca. 80000 eine bessere Auftrennung ermöglicht. Die so gereinigten Komplexe wurden durch eine analytische Gelfiltrationschromatographie untersucht (3.4.3., Abbildung 4.1.16 B). Die Retentionszeit beider Komplexe betrug 9,33 Minuten. Dies entspricht im Vergleich zu den Standardproteinen einem Molekulargewicht von ca. 83000. Das Elutionsprofil der Variante Tim10C/Tim9C zeigte zudem eine Schulter bei 10,39 Minuten. Dies entspricht einem Molekulargewicht von ca. 57500. Tabelle 4.1.4 zeigt eine Übersicht über die Aminosäuresequenz der funktionalisierten Bereiche, dem Molekulargewicht der Untereinheiten und der Ausbeute an Gesamtprotein, normiert auf 1 L Kulturmedium einer OD<sub>600</sub> von 0,5.

**Tabelle 4.1.4:** Ausbeuten der Varianten Tim10N/Tim9C und Tim10C/Tim9C.

Plasmid	Peptidsequenza	M <sub>r</sub> <sup>b</sup>	Ausbeute <sup>b</sup> (mg)
pETDuet-1-Tim10C-Tim9C	PAG <u>S</u> YPYDVPDYAVD* PRRSE <u>Q</u> KLISEEDLLE*	14394 (Tim10) 12157 (Tim9)	0,656
pETDuet-1-Tim10N-Tim9C	QSG <u>S</u> YPYDVPDYAVDMD PRRSE <u>Q</u> KLISEEDLLE*	14283 (Tim10) 12157 (Tim9)	6,7

<sup>a</sup>: Aminosäuresequenz der funktionalisierten Bereiche, zur nativen Untereinheit veränderte Aminosäuren sind hervorgehoben. **Fett:** tag zur Detektion, Unterstrichen: Aminosäuren die durch Restriktionsschnittstellen hinzugefügt wurden.

<sup>b</sup>: Die Ausbeute bezieht sich auf je 1 l Kulturmedium, normiert auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5.

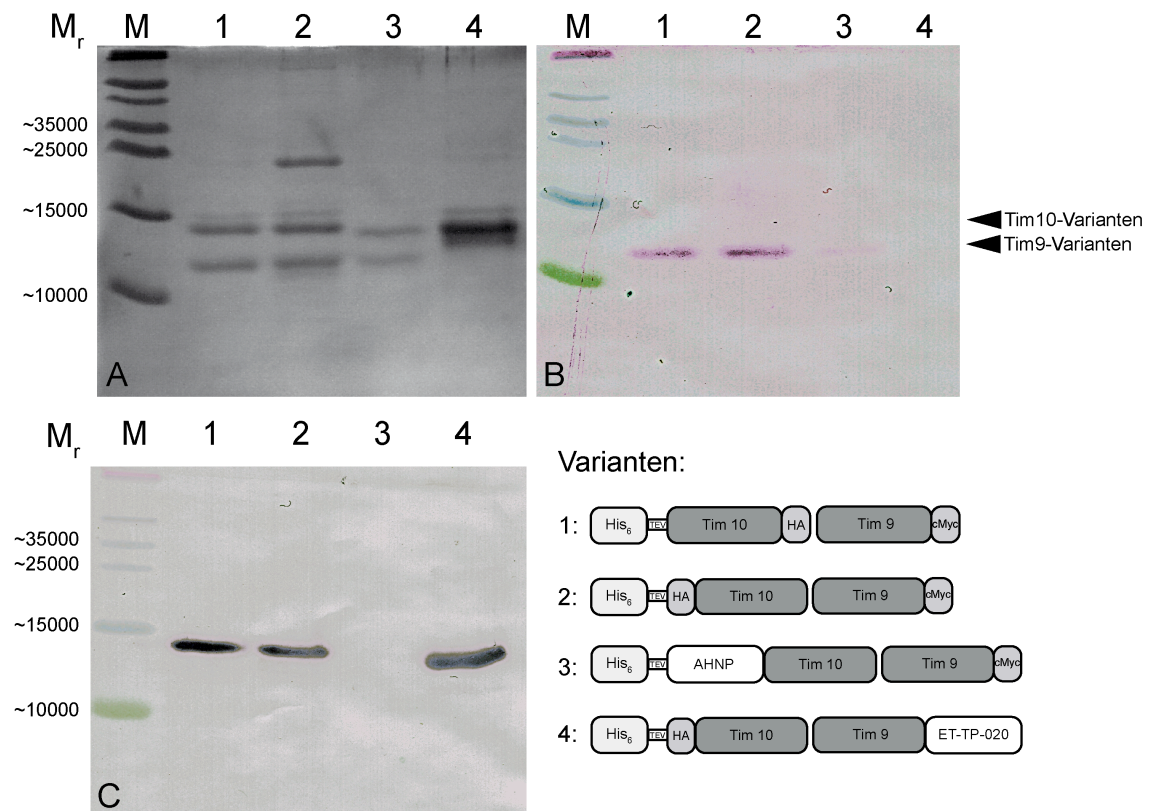


**Abbildung 4.1.16:** Präparative Gelfiltrationschromatographie der Varianten **(A)** Tim10N/Tim9C und **(B)** Tim10C/Tim9C. Der grau hinterlegte Bereich wurde separat aufgefangen. Analytische Gelfiltrationschromatographie der Varianten **(C)** Tim10N/Tim9C und **(D)** Tim10C/Tim9C. Das Diagramm zeigt die optische Dichte bei  $\lambda = 220$  nm in Abhängigkeit von der Zeit.

Für die Proteinausbeute der Variante Tim10N/Tim9C konnte ein 10-fach höherer Wert gegenüber der Variante Tim10C/Tim9C ermittelt werden. Zur weiteren Analyse wurde ein *Western-Blot* durchgeführt (3.3.10, Abbildung 4.1.17). Abbildung 4.1.17 A zeigt das mit Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgel. Als Kontrollen wurden die Konstrukte Tim10N-AHNP/Tim9C und Tim10N/Tim9C-ET-TP-020 mitgeführt. Bei diesen Konstrukten wurde das HA-Epitop (Tim10N-AHNP/Tim9C) bzw. das cMyc-Epitop (Tim10N/Tim9C-ET-TP-020) ausgetauscht (siehe Abbildung 4.1.7). Eine nähere Beschreibung der Konstrukte erfolgt im Abschnitt 4.2.. Die Detektion der Tim10-Untereinheit erfolgte indirekt mit einem spezifischen Antikörper gegen den fusionierten HA-tag (Abbildung 4.1.17 B). Die Detektion der Tim9-Untereinheit erfolgte indirekt über den fusionierten cMyc-tag (Abbildung 4.1.17 C). Auf Abbildung 4.1.17 A konnte in jeder Spur Proteinbanden

#### 4. Ergebnisse

bei den erwarteten Größen von ca. 14000 für die Tim10-Untereinheit und 12000 für die Tim9-Untereinheit nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte auf der Spur 2 (Tim10C/Tim9C) eine Bande bei ca. 25000 und eine sehr schwache Bande oberhalb von 55000 nachgewiesen werden. Bei der Detektion des cMyc-tags an der Tim9-Untereinheit (Abb. 4.1.17 B) und bei der Detektion des HA-tags an der Tim10-Untereinheit (Abb. 4.1.17 C) konnten jeweils nur eine Bande bei der erwarteten Höhe nachgewiesen werden.



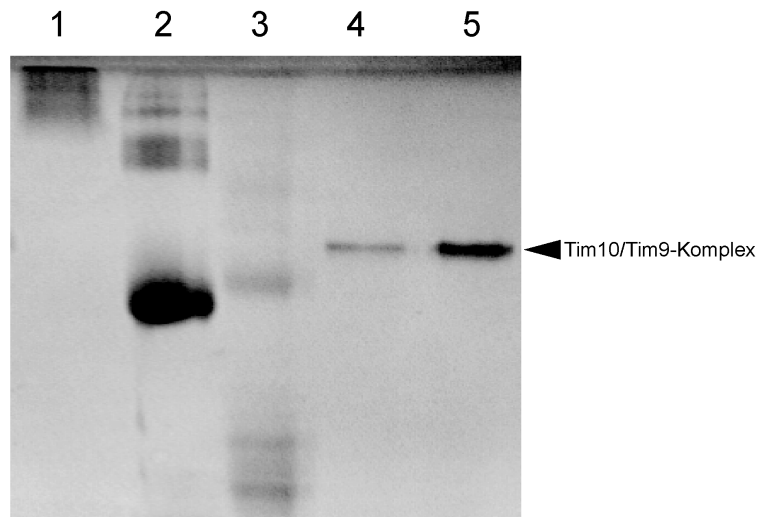
**Abb. 4.1.17:** Western-Blot der Varianten Tim10N/Tim9C und Tim10C/Tim9C. M: Fermentas® PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 1: Tim10C/Tim9C, 2: Tim10N/Tim9C, 3: Tim10N-AHNP/Tim9C, 4: Tim10N/Tim9C-ET-TP-020. **A:** Färbung mit Coomassie-Färbelösung, **B:** Detektion des cMyc-Epitops, **C:** Detektion des HA-Epitops. HA: HA-Epitop, cMyc: cMyc-Epitop, AHNP: ErbB2-bindendes Peptid, ET-TP-020: cMpl-bindendes Mikropotein.

Neben der analytischen Gelfiltration wurde zusätzlich durch eine BN-PAGE die Oligomerisierung der epitopfunktionalisierten Varianten überprüft (3.3.9., Abbildung 4.1.18). Auf den Spuren 4 und 5 der Abbildung 4.1.18 konnte jeweils nur eine distinkte Bande in der erwarteten Höhe der Tim10/Tim9-Komplexvarianten nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine korrekte Assemblierung eines hexameren funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplex hin.

#### 4. Ergebnisse

---

Da mit dem dualen Expressionssystem funktionalisierte hexamere Tim10/Tim9-Komplexe in ausreichender Menge hergestellt werden konnten wurde nun die Oligomerisierung biologisch relevanter Peptide und Proteine untersucht.



**Abb. 4.1.18:** BN-PAGE der Varianten Tim10N/Tim9C und Tim10C/Tim9C. 1:  $\gamma$ -Globulin aus dem Schwein ( $M_r$ : 58000), 2: Rinderserumalbumin ( $M_r$ : 66200), 3: Albumin aus Hühnereiweiß ( $M_r$ : 45000), 4: Tim10N/Tim9C, 5: Tim10C/Tim9C.

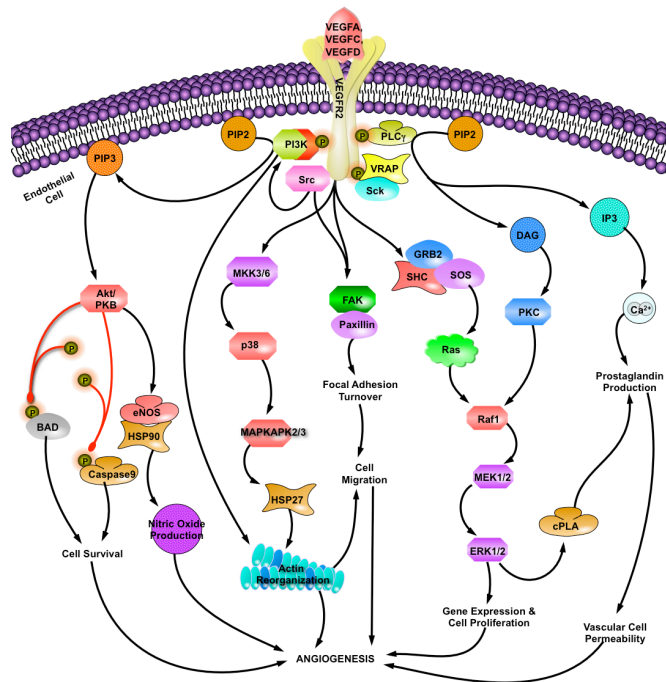
### 4.2. Untersuchungen zur biologischen Aktivität funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe

Nachdem die Oligomerisierung funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe im letzten Abschnitt gezeigt werden konnte, soll im folgendem Abschnitt die Funktionalisierung mit biologisch relevanten Bindemolekülen überprüft werden. Dafür wurden Tim10/Tim9-Komplexe mit pseudozyklischen Bindepeptiden funktionalisiert und somit monospezifische (4.2.1) und bispizifische funktionalisierte Tim10/Tim9-Komplexe (4.2.2) hergestellt. Zudem wurde ein hinsichtlich seiner Faltung komplexes Mikroprotein über den Tim10/Tim9-Komplex oligomerisiert (4.2.3).

#### 4.2.1. Untersuchungen zu monospezifischen funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexen

Als Modellsystem für die monospezifische Funktionalisierung von Tim10/Tim9-Komplexen wurde der durch den vaskulo-endothelialen Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) induzierte Signaltransduktionsweg gewählt. VEGF ist ein hochspezifisches Mitogen für Endothelzellen und ist sowohl für die Vasculogenese in der Embryonalzeit als auch für die Angiogenese zuständig [91]. Während die Neubildung von Blutgefäßen (Neoangiogenese) im embryonalen Stadium von großer Bedeutung ist, kommt sie im adulten Lebewesen nur noch bei erhöhten Bedarf, zum Beispiel bei der Wundheilung vor [92]. Somit wird die Neoangiogenese beim adulten Lebewesen häufig durch verschiedene Krankheiten induziert. So konnte gezeigt werden, dass die Angiogenese für das Wachstum, die Metastatisierung und für das Überleben von Tumorzellen notwendig ist [93, 94]. Dies wird auch durch die Expression der vaskulo-endothelialen Wachstumsfaktor Rezeptoren (*vascular endothelial growth factor receptor*, VEGFR) auf Tumorzellen, wie zum Beispiel den humanen malignen Melanomzellen, bestätigt [95]. Für die Aktivierung des VEGF Signaltransduktionsweges sind drei verschiedene Rezeptoren zuständig. Die Rezeptoren VEGFR-1 (Flt1), VEGFR-2 (KDR/Flk1) und VEGFR-3 (Flt4). Die Induktion über den Rezeptor VEGFR-2 ist der Hauptsignaltransduktionsweg der Angiogenese und Mitogenese von Endothelzellen [96, 97]. Dies wurde von Keyt und Kollegen durch VEGF-Mutanten gezeigt, welche entweder den VEGFR-1 oder VEGFR-2 binden konnten [98].

Folglich kann eine Inhibition des Signaltransduktionsweges auch zu einer Inhibierung des Tumorwachstum führen [13]. VEGFR-2 ist sowohl auf der luminalen als auch auf der abluminalen Seite von tumorösen Endothelzellen zu finden [99-101]. Eine Beeinflussung der Aktivität des VEGFR-2 ist daher für die molekulare Wirkstoffforschung vom hohen Interesse. Ein Schema des durch den Rezeptor VEGFR-2 (KDR) vermittelten Transduktionsweges ist in Abbildung 4.2.1 dargestellt.



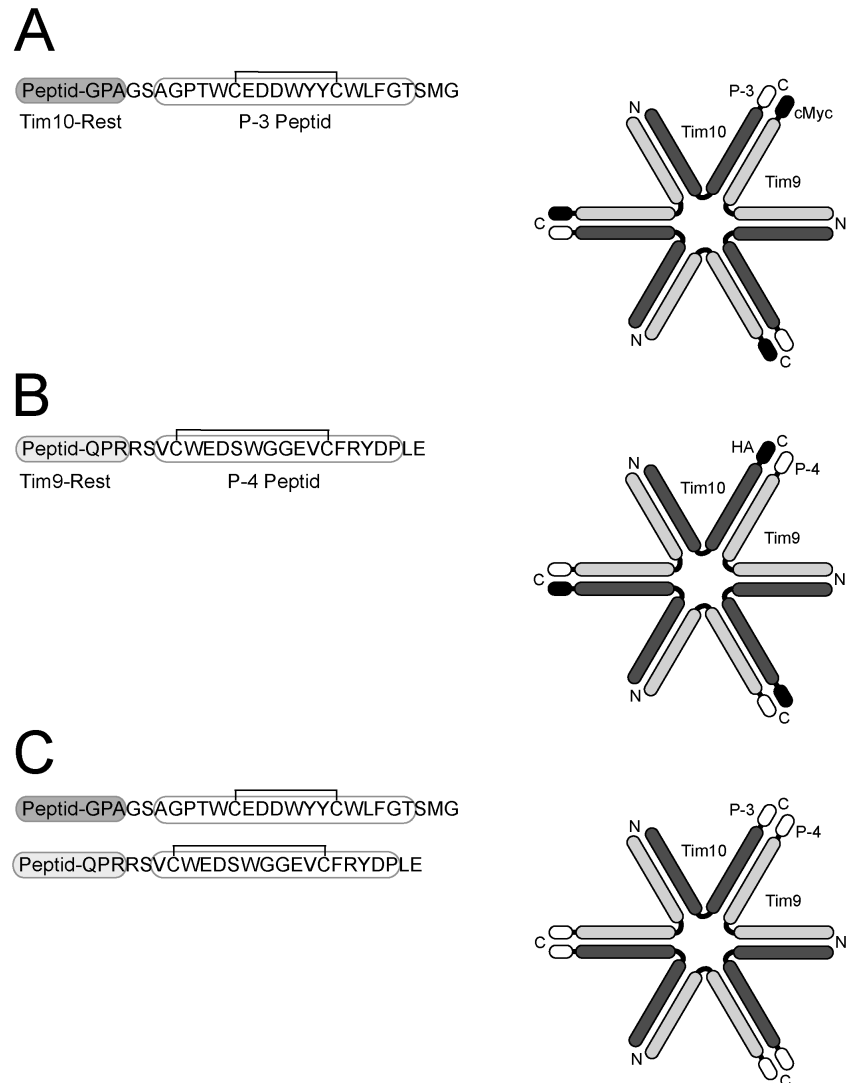
**Abb. 4.2.1:** Schematische Darstellung der durch VEGF induzierten Signaltransduktionskaskade bei der Aktivierung des Rezeptors VEGFR-2. Modifiziert nach [www.proteinlounge.com](http://www.proteinlounge.com).

Shrivastava und Kollegen haben durch Durchmusterung einer auf Phagen basierenden Peptidbibliothek hochaffine Binder gegen den VEGFR-2 Rezeptor selektiert [102]. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Homo- und Heterooligomerisierung verschiedener selektierter Peptide eine stärkere Bindung an den VEGFR2-Rezeptor und somit auch eine niedrigere Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) erzielt werden konnte. Insbesondere durch die Heterodimerisierung der beiden Peptide P-3 (Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK-NH<sub>2</sub>) und P-4 (Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK-NH<sub>2</sub>) konnte eine  $K_d$  im pikomolaren Bereich gemessen werden. In dieser Arbeit sollten Homo- und Heterooligomere der beiden Peptide P-3 und P-4 über den mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplex generiert

und die Bindung dieser funktionalisierten Varianten an den VEGFR-2 untersucht werden.

### 4.2.1.1 Konzeption, Klonierung und Expression der funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe

Für die Untersuchungen zur Homo- und Heterooligomerisierung und der damit verbundenen Aviditätseffekte der VEGFR2-bindenden pseudozyklischen Peptide P-3 und P-4 wurden insgesamt drei verschiedene Varianten hergestellt (siehe Abbildung 4.2.2). Je eine Variante zur Homotrimerisierung der Peptide P-3 und P-4 als C-terminale Fusion. Das P-3 Peptid wurde dabei an die Tim10- (Tim10C-P-3/Tim9C) und das P-4 Peptid an die Tim9-Untereinheit (Tim10C/Tim9C-P-4) fusioniert.



**Abb. 4.2.2:** Schematische Darstellung der funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe. **A:** Tim10C-P-3/Tim9C. **B:** Tim10C/Tim9C-P-4. **C:** Tim10C-P-3/Tim9C-P-4.



#### 4. Ergebnisse

Für die Heterooligomerisierung wurden diese beiden Varianten kombiniert (Tim10C-P-3/Tim9C-P-4). Die Klonierung erfolgte analog zu der in Abschnitt 4.1.3 beschriebenen Variante Tim10C/Tim9C unter der Verwendung der Oligonukleotide Tim10\_BglII\_TEV\_up, Tim10\_P3\_lo1 und Tim10\_P3\_lo2 zur Amplifikation des Tim10-Gens mit C-terminal fusionierten P-3 Peptid und der Oligonukleotide Tim9\_NdeI\_Duet\_up, Tim9\_P4\_lo1 und Tim9\_P4\_lo2 zur Amplifikation des Tim9-Gens mit C-terminal fusionierten P-4 Peptid (3.2.9.).

Die Expression und Reinigung der Varianten erfolgte wie in Abschnitt 4.1.3 beschrieben in je 1 L LB-Medium. Eine Übersicht über die durchschnittliche Ausbeute an Fusionsprotein normiert auf 1 L Zellkultur einer OD<sub>600</sub> von 0,5 ist in Tabelle 4.2.1 angegeben.

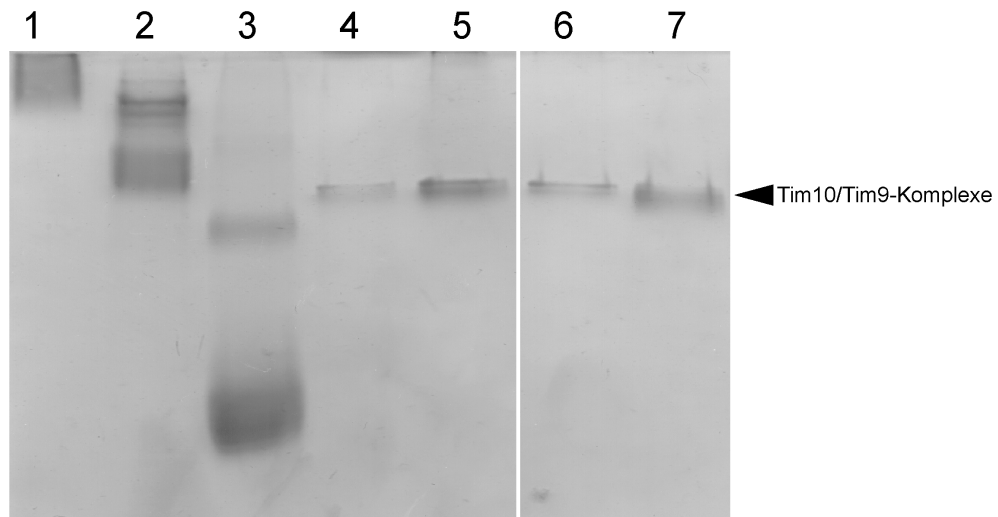
**Tabelle 4.2.1:** Ausbeuten der monospezifischen funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe.

Protein	Peptidsequenz <sup>a</sup>	M <sub>r</sub>	Ausbeute <sup>b</sup> (mg)
6HTEVTim10C-P3 Tim9C	PAG <u>S</u> AGPTWCEDDWYYCWLFGT <u>SMG</u> * PRR <u>S</u> EQKLISEEDL <u>L</u> E*	15538 (Tim10C-P-3) 12157 (Tim9C)	0,169
6HTEVTim10C Tim9C-P4	PAG <u>S</u> YPYDVDPDYAVD* PRR <u>S</u> VCWEDSWGGEVCFRYDP <u>L</u> E*	14283 (Tim10C) 13000 (Tim9C-P-4)	0,146
6HTEVTim10C-P3 Tim9C-P4	PAG <u>S</u> AGPTWCEDDWYYCWLFGT <u>SMG</u> * PRR <u>S</u> VCWEDSWGGEVCFRYDP <u>L</u> E*	15538 (Tim10C-P-3) 13000 (Tim9C-P-4)	0,122

<sup>a</sup>: Aminosäuresequenz der funktionalisierten Bereiche. Zur nativen Untereinheit veränderte Aminosäuren sind hervorgehoben, **Fett**: funktionalisierter Bereich, Unterstrichen: Aminosäuren die durch Restriktionsschnittstellen hinzugefügt wurden. \*C-terminales Ende des Proteins.

<sup>b</sup>: Die Ausbeute bezieht sich auf je 1 L Kulturmedium, normiert auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5.

Im Durchschnitt betrug die Ausbeute an funktionalisiertem Protein zwischen 122 und 169 µg je Liter Zellkultur einer OD<sub>600</sub> von 0,5. Damit liegt die Gesamtausbeute im Vergleich zu den nativen Varianten um den Faktor 3-60 niedriger. Weiterhin wurde die Oligomerisierung der funktionalisierten Varianten durch BN-PAGE überprüft (3.3.9., Abbildung 4.2.3).



**Abb. 4.2.3:** BN-PAGE der funktionalisierten VEGFR2-bindenden Tim10/Tim9-Komplexe. 1:  $\gamma$ -Globulin aus dem Schwein ( $M_r$ : 150000), 2: Conalbumin ( $M_r$ : 74000), 3: Ovalbumin ( $M_r$ : 43000), 4: Tim10C/Tim9C, 5: Tim10C-P-3/Tim9C, 6: Tim10C/Tim9C-P-4, 7: Tim10C-P-3/Tim9C-P-4.

Bei einer erfolgreichen Oligomerisierung sollte nur jeweils eine distinkte Bande je Spur detektiert werden. In jeder Spur der BN-PAGE (Abbildung 4.2.3, Spur 4-7) zeigten die Proben jedoch distinkte Doppelbanden, welche nah beieinanderliegen. Da diese Doppelbande auch bei der im vorherigen Kapitel analysierten Variante Tim10C/Tim9C vorliegt, kann von einem gelspezifischen Artefakt ausgegangen werden. Aus diesem Grund wird hier von einer erfolgreichen Oligomerisierung der funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe ausgegangen. Im nächsten Schritt wurde nun die Bindung der funktionalisierten Varianten an den VEGFR-2 analysiert.

##### 4.2.1.2 Bindungsuntersuchungen an VEGFR-2

Zur Analyse der Bindung der generierten funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe an VEGFR-2 wurde die Methode der *Biolayer* Interferometrie gewählt. Als Rezeptor wurde der rekombinante humane VEGFR-2 als Fc-Chimäre (R&D Systems®, Minneapolis, U.S.A) verwendet. Die Immobilisierung des Rezeptors erfolgte an ProteinA-Sensoren. Als Negativkontrolle wurde die Variante Tim10C/Tim9C mitgeführt und die ermittelten Werte von allen anderen Messwerten abgezogen. Das Programm wurde entsprechend 3.3.11. durchgeführt. Die ermittelten Dissoziationskonstanten und Vergleichswerte aus der Literatur sind in Tabelle 4.2.2 angegeben. Die ausgewerteten Messkurven der Affinitätsmessung sind in Abbildung 4.2.4 dargestellt. Sie zeigen den relativen

#### 4. Ergebnisse

Schichtdickenzuwachs in Abhängigkeit von der Zeit. Die jeweiligen Messkurven der Assoziation und der Dissoziation sind in blau und die berechnete Angleichungskurve in rot dargestellt.

**Tabelle 4.2.2:** Ermittelte apparente Dissoziationskonstanten der funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe.

Protein	Rezeptor	Sensor	Messpunkte (nM)	$\chi^2$ <sup>a</sup>	$R^2$ <sup>b</sup>	$K_d^c$ (nM)	$K_d^d$ (nM)	Literature <sup>e</sup>
Tim10C-P-3/Tim9C	VEGFR-2/Fc Chimäre	ProteinA	240	0,02	0,65	13	20	7
			400	0,07	0,94	26		
Tim10C/Tim9C-P-4	VEGFR-2/Fc Chimäre	ProteinA	240	0,005	0,97	78	68	299
			400	0,054	0,97	57		
Tim10C-P-3/Tim9C-P-4	VEGFR-2/Fc Chimäre	ProteinA	240	0,01	0,7	-	-	0,5

a: Summe der quadratischen Abweichungen der Angleichskurve von der gemessenen Assoziation und Dissoziation.

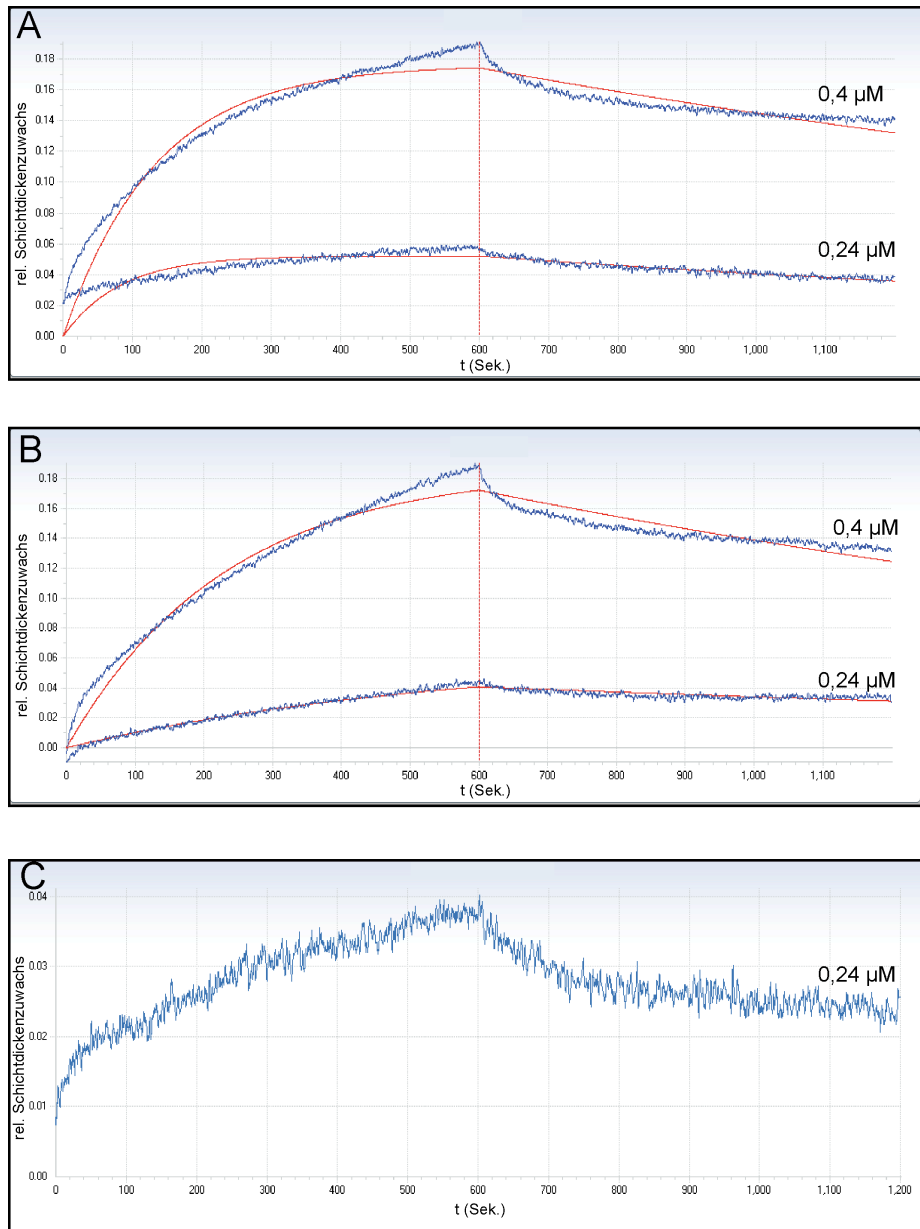
b: Bestimmtheitsmaß der Angleichskurve.

c: apparente Dissoziationskonstante, bestimmt nach 1:1 Langmuir-Modell und *local fitting*.

d: Mittelwert der errechneten apparenten  $K_d$ .

e: Dissoziationskonstanten homo- und heterodimerer Peptide aus [102].

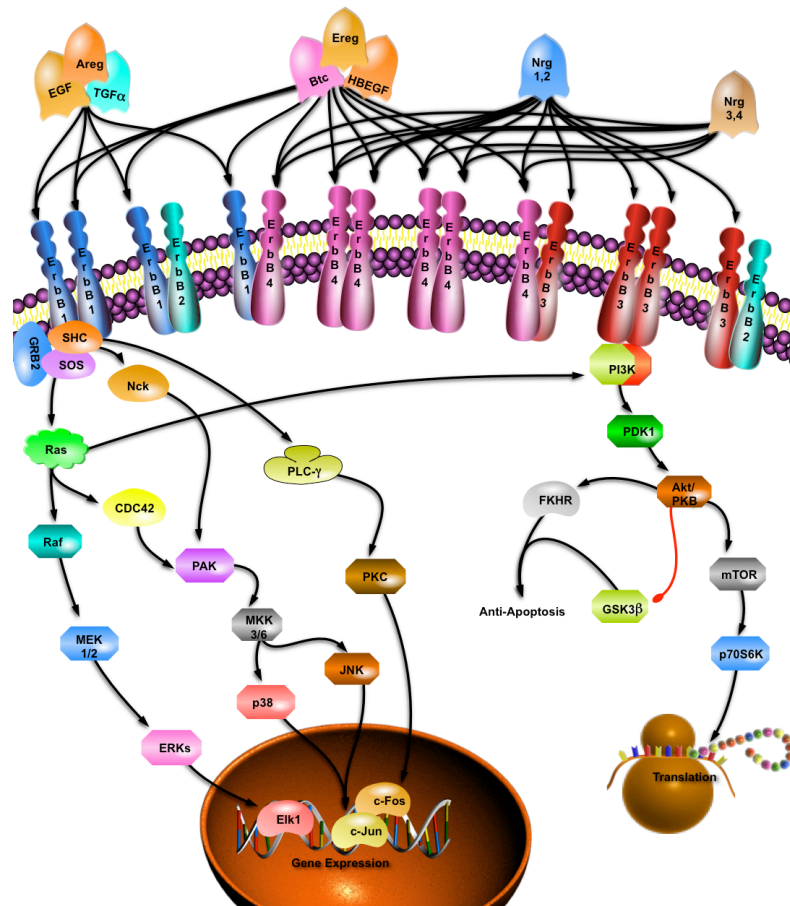
Alle Varianten zeigten eine spezifische Bindung an den VEGFR-2. Bei der Variante Tim10C-P-3/Tim9C-P-4 konnte eine starke Abweichung des einfachen 1:1 Modells zur Berechnung der Dissoziationskonstante beobachtet werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist dies auf die simultane Bindung von P-3 und P-4 an den Rezeptor zurückzuführen. Da es sich zudem um eine Einzelmessung handelte, wurde die apparente Dissoziationskonstante nicht berechnet. Die für die Varianten Tim10C-P-3/Tim9C und Tim10C/Tim9C-P-4 ermittelten Dissoziationskonstanten lagen im zweistellig nanomolaren Bereich. Im Vergleich zu den Literaturwerten dimerer Varianten konnte bei der Trimerisierung des P-4 Peptids eine Erniedrigung der Dissoziationskonstante ermittelt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Generierung monospezifischer funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe möglich ist. Daher wurde im nächsten Abschnitt eine bispezifische Variante generiert und untersucht.



**Abb. 4.2.4:** Bindungsanalyse funktionalisierter VEGFR2-bindender Tim10/Tim9-Komplexe. **A:** Tim10C-P-3/Tim9C, **B:** Tim10C/Tim9C-P-4 und **C:** Tim10C-P-3/Tim9C-P-4.

### 4.2.2. Untersuchungen zu bispezifischen funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexen

Neben den VEGF-Rezeptoren spielt auch die Familie der epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor-Tyrosinkinasen bei der Pathogenese verschiedener Krebsformen eine wichtige Rolle. Zu der Familie gehören die vier verschiedene Rezeptoren EGFR (*epidermal growth factor receptor*), ErbB2, ErbB3 und ErbB4 [12]. Ein Schema der durch die ErbB-Rezeptoren vermittelten Signaltransduktionskaskade ist in Abbildung 4.2.5 dargestellt.



**Abb. 4.2.5:** Schematische Darstellung der durch die ErbB Rezeptorfamilie vermittelten Signaltransduktionskaskade. Modifiziert nach [www.proteinlounge.com](http://www.proteinlounge.com).

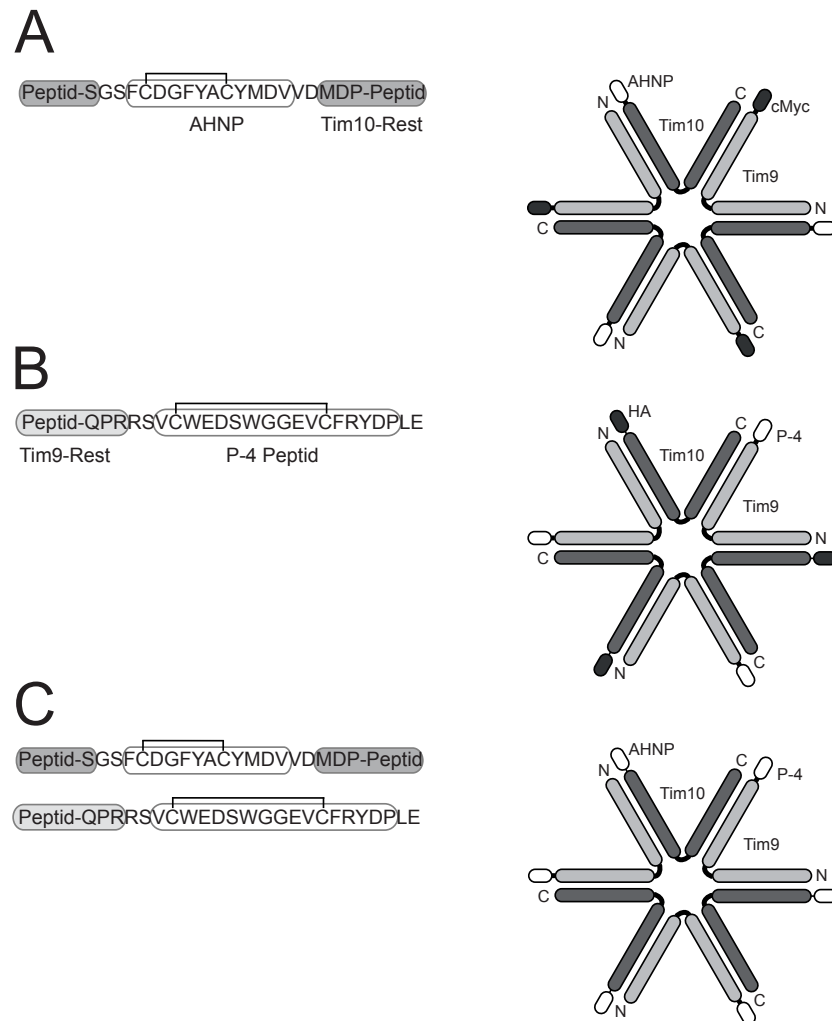
ErbB2 oder auch HER2/neu (*human epidermal growth factor receptor 2*) genannt, stimuliert die Zellproliferation über den Ras-MAP-Kinase-Weg (MAP, *mitogen-activated protein*) und hemmt die Apoptose über den *phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin* (mTOR) Signalweg [103]. Das p185<sup>HER2/neu</sup> Onkoprotein ist in ungefähr 25-35 % der Fälle bei Brust-, Eierstock und Darmkrebsfällen überexprimiert [104, 105]. Monoklonale Antikörper gegen die Ektodomänen p185<sup>neu</sup> und p185<sup>HER2/neu</sup>, wie Herceptin konnten das Tumorstadium *in vivo* inhibieren [106]. Neben der monospezifischen Inhibition von Signaltransduktionswegen spielt die Kombination von Inhibitoren verschiedener Zielproteine in der Krebstherapie eine immer größere Rolle. So konnte in verschiedenen Arbeiten durch die kombinierte Inhibition des VEGF und des ErbB2 Signaltransduktionswegs eine höhere Inhibition von Tumorstadium erzielt werden [107-109].

Park und Kollegen haben einen rational designtes anti-Her2/neu mimetisches Peptid (AHNP) hergestellt, welches sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die p185<sup>HER2/neu</sup>

Tyrosinkinase inhibiert [110]. Für dieses pseudozyklische Peptid konnte eine Dissoziationskonstante von 300 nM bestimmt werden, welche durch Tetramerisierung über Bindung des biotinylierten Peptids an Streptavidin auf 8,8 nM verbessert werden konnte [111]. In diesem Abschnitt soll das AHNP über den Tim10/Tim9-Komplex trimerisiert und eine bispezifische Variante gegen VEGF und ErbB2 hergestellt werden.

### 4.2.2.1. Konzeption, Klonierung und Expression der funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe

Zur Überprüfung der bispezifischen Variante wurden insgesamt drei verschiedene Konstrukte hergestellt (siehe Abbildung 4.2.6). Die Fusionierung des AHNP erfolgte N-terminal an die Tim10-Untereinheit.



**Abb. 4.2.6:** Schematische Darstellung der funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe. **A:** Tim10N-AHNP/Tim9C. **B:** Tim10N/Tim9C-P-4. **C:** Tim10N-AHNP/Tim9C-P-4.

#### 4. Ergebnisse

Das P-4-Peptid wurde wie im Abschnitt 4.2.1 beschrieben C-terminal an die Tim9-Untereinheit fusioniert. Somit ergeben sich die beiden monospezifischen Varianten Tim10N-AHNP/Tim9C und Tim10N/Tim9C-P-4 als Kontrollen und die bispezifische Variante Tim10N-AHNP/Tim9C-P-4. Die Klonierung erfolgte analog zu den in Abschnitt 4.1.3 beschriebenen Variante Tim10N/Tim9C unter der Verwendung der Oligonukleotide Tim10\_BglII\_TEV\_up, Tim10\_P3\_lo1 und Tim10\_P3\_lo2 zur Amplifikation des Tim10-Gens mit N-terminal fusionierten AHNP und den Oligonukleotiden Tim9\_NdeI\_Duet\_up, Tim9\_P4\_lo1 und Tim9\_P4\_lo2 zur Amplifikation des Tim9-Gens mit C-terminal fusionierten P-4 Peptid (3.2.9.).

Die Expression und Reinigung der Varianten erfolgte wie in Abschnitt 4.1.3 beschrieben in je 1 L LB-Medium. Eine Übersicht über die durchschnittlichen Ausbeuten an Fusionsprotein aus 1 L Zellkultur einer OD<sub>600</sub> von 0,5 ist in Tabelle 4.2.3 angegeben.

**Tabelle 4.2.3:** Ausbeuten der bispezifischen Tim10/Tim9-Komplexe.

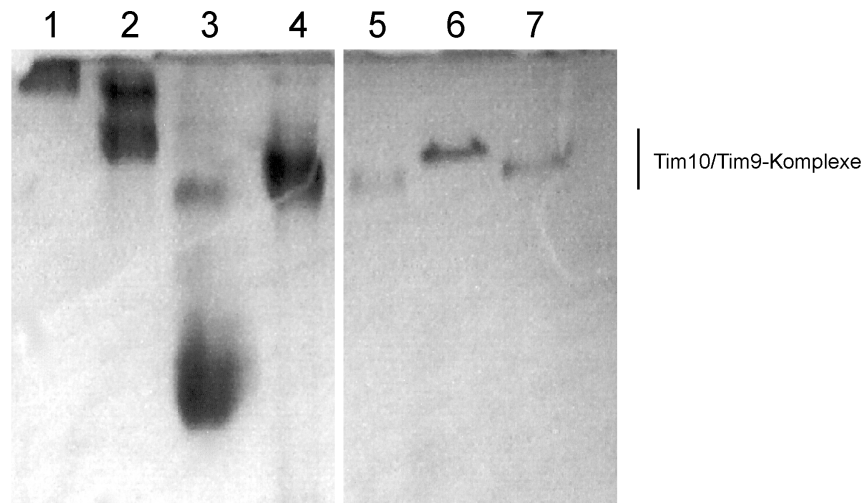
Protein	Peptidsequenz <sup>a</sup>	M <sub>r</sub> <sup>b</sup>	Ausbeute <sup>b</sup> (mg)
Tim10N-AHNP/Tim9C	QSGSFCDFYACYMDVVDM PRRSEQKLISEEDLLE*	14721,41 (Tim10N-AHNP)	1,798
		12157,02 (Tim9C)	
Tim10N/Tim9C-P-4	QSGSYPYDVPDYAVDM PRRSVCWEDSWGGEVCFRYDPLE*	14282,86 (Tim10N)	0,274
		12999,96 (Tim9C-P-4)	
Tim10N-AHNP/Tim9C-P-4	QSGSFCDFYACYMDVVDM PRRSVCWEDSWGGEVCFRYDPLE*	14721,41 (Tim10N-AHNP)	0,607
		12999,96 (Tim9C-P-4)	

<sup>a</sup>: Aminosäuresequenz der funktionalisierten Bereiche. Zur nativen Untereinheit veränderte Aminosäuren sind hervorgehoben, **Fett**: funktionalisierter Bereich, Unterstrichen: Aminosäuren die durch Restriktionsschnittstellen hinzugefügt wurden. \*: C-terminales Ende des Proteins.

<sup>b</sup>: Die Ausbeute bezieht sich auf je 1 L Kulturmedium, normiert auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5.

Die durchschnittliche Ausbeute der funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe lag zwischen 274 µg bei der Variante Tim10N-Tim9C-P-4 und 1,8 mg bei der Variante Tim10N-AHNP/Tim9C. Die Ausbeute der mit AHNP funktionalisierten Varianten ist um den Faktor 3,6 bis 10 höher im Vergleich zu den monospezifischen Varianten.

Die Analyse der Oligomerisierung der bispezifischen Varianten erfolgte durch BN-PAGE (3.3.9., Abbildung 4.2.7).



**Abb. 4.2.7:** BN-PAGE der funktionalisierten ErbB2- und VEGFR-2-bindenden Tim10/Tim9-Komplexe. 1:  $\gamma$ -Globulin aus dem Schwein ( $M_r$ : 150000), 2: Conalbumin ( $M_r$ : 74000), 3: Ovalbumin ( $M_r$ : 43000), 4: Tim10N/Tim9C, 5: Tim10N/Tim9C-P-4, 6: Tim10N-AHNP/Tim9C, 7: Tim10N-AHNP/Tim9C-P-4.

Jede Probe zeigte eine distinkte Bande in erwartete Höhe. Dabei liefen die Varianten mit N-terminal fusionierten AHNP etwas oberhalb der anderen Varianten. Da die gezeigten Ergebnisse auf eine erfolgreiche Oligomerisierung der funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe hindeuten, wurde nun die Bindung an die Rezeptoren VEGFR-2 und ErbB2 analysiert.

##### 4.2.2.2 Bindungsuntersuchungen an den ErbB2-Rezeptor und VEGFR-2

Für die Analyse der Bindung an den ErbB2-Rezeptor wurde der ErbB2-Rezeptor als eine Fc-Chimäre verwendet (R&D Systems®, Minneapolis, U.S.A.). Die Analyse der Bindung erfolgte analog zum Abschnitt 4.2.1 durch Immobilisierung der Rezeptoren an ProteinA-Sensoren. Als Negativkontrolle zur Vermessung der monospezifischen Varianten diente das Kontrollkonstrukt Tim10N/Tim9C. Für die bispezifischen Varianten wurden die jeweils monospezifischen Varianten der alternativen Spezifität mitgeführt. Die Messpunkte der Negativkontrollen wurden von den Rohdaten der Konzentrationsreihe abgezogen. Die Auswertung der Assoziations- und Dissoziationskurven erfolgte mit dem fortéBIO Analyseprogramm (3.3.11, Tabelle 4.2.4, Abb. 4.2.8). Der relative Schichtdickenzuwachs in Abhängigkeit von der Zeit ist in Abbildung 4.2.8 gezeigt. Die jeweiligen Messkurven der Assoziation und der Dissoziation sind in blau und



die berechnete Angleichungskurve in rot dargestellt.

**Tabelle 4.2.4:** Ermittelte Dissoziationskonstanten der funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe.

Protein	Rezeptor	Sensor	Meßpunkte (nM)	$\chi^2$ <sup>a</sup>	$R^2$ <sup>b</sup>	$K_d^c$ (nM)	$K_d^d$ (nM)	Literatur
Tim10N-AHNP/Tim9C	ErbB2/Fc	ProteinA	500	0,003	0,88	44	43	300 <sup>e</sup>
	Chimäre		700	0,005	0,07	42		
Tim10N/Tim9C-P4	VEGFR-2/Fc	ProteinA	100	0,007	0,99	11	8,5	299 <sup>f</sup>
			250	0,030	0,97	8,2	9,5*	
	Chimäre		500	0,242	0,84	6,3		
Tim10N-AHNP/Tim9C-P-4	ErbB2/Fc	ProteinA	500	0,006	0,86	20	31	300 <sup>e</sup>
	Chimäre		750	0,032	0,82	42		
Tim10N-AHNP/Tim9C-P-4	VEGFR-2/Fc	ProteinA	250	0,01	0,99	4,4	6	299 <sup>f</sup>
			500	0,11	0,93	6,5	5,5*	
	Chimäre		750	0,33	0,83	6,7		

a: Summe der quadratischen Abweichungen der Angleichskurve von der gemessenen Assoziation und Dissoziation.

b: Bestimmtheitsmaß der Angleichskurve.

c: apparente Dissoziationskonstante, bestimmt nach 1:1 Langmuir-Modell und *local fitting*.

d: Mittelwert der errechneten apparenten  $K_d$ .

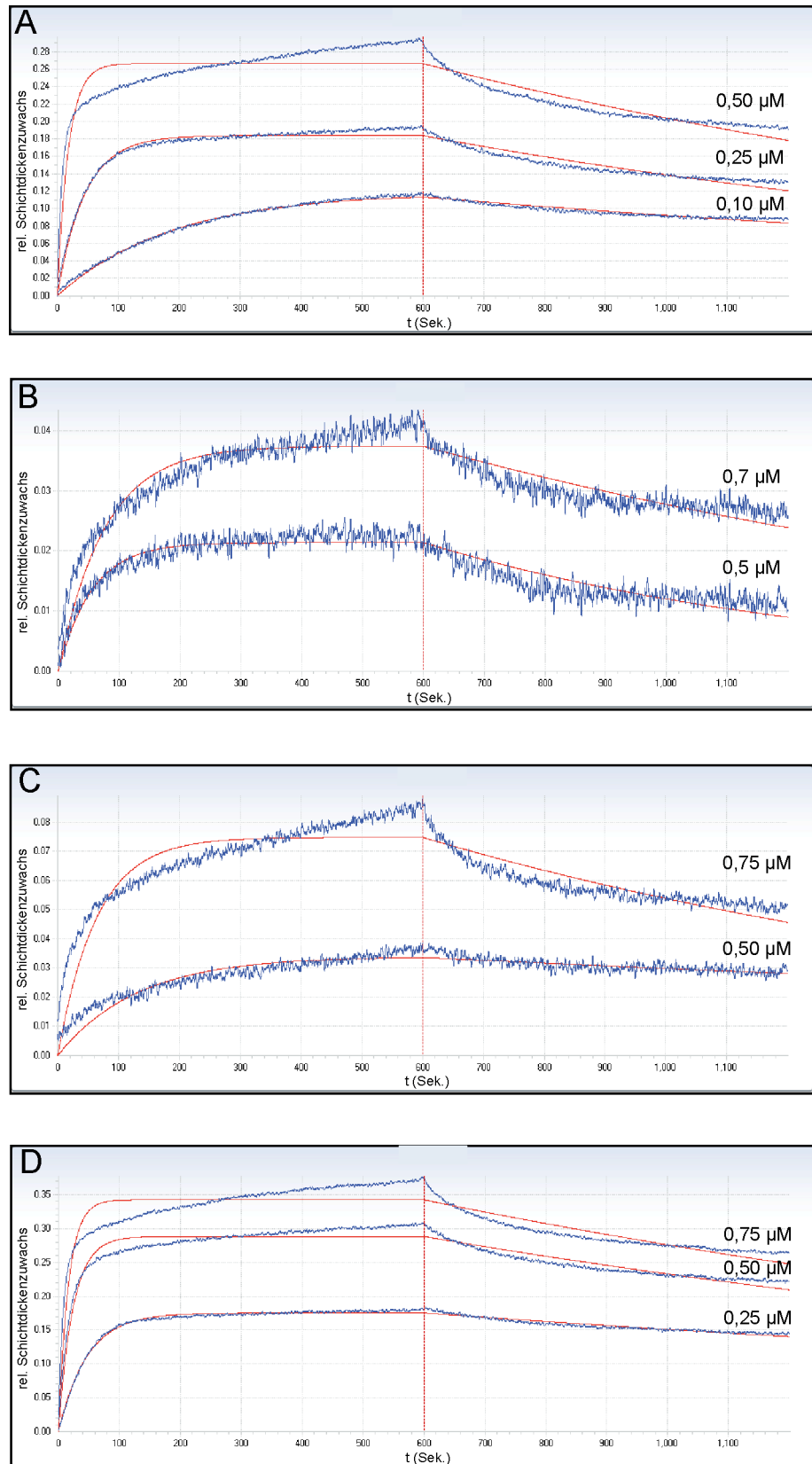
e: Dissoziationskonstante des monomeren AHNP aus [110].

f: Dissoziationskonstante des dimeren P-4 Peptids aus [102].

\*Mittelwert der zwei niedrigsten eingesetzten Konzentrationen.

Die untersuchten mono- und bispezifischen Varianten zeigten eine konzentrationsabhängige und spezifische Bindung an die jeweiligen Rezeptoren. Die ermittelten apparenten Dissoziationskonstanten für alle drei Konstrukte lagen für die jeweiligen Rezeptoren im selben Bereich. Für die Bindung des AHNP an den ErbB2-Rezeptor konnte in beiden Fällen eine apparente  $K_d$  im zweistellig nanomolaren Bereich bestimmt werden. Diese liegt somit zwischen der Dissoziationskonstante, die für das monomere Peptid bestimmt wurde (300 nM) und einer tetrameren, durch Streptavidin oligomerisierte Variante (8,8 nM, [111]). Die Bindung an den Rezeptor VEGFR-2 wurde in beiden Fällen im einstelligen nanomolaren Bereich gemessen (6 und 9 nM). Die Varianten zeigen demnach eine stärkere Avidität auf, als die im Abschnitt 4.2.1 gemessene Variante Tim10C/Tim9C-P-4 und dem in der Literatur beschriebenen homodimeren Peptid. Die unterschiedliche Affinität des Konstrukts Tim10C/Tim9C-P-4 und der hier untersuchten VEGFR-2-bindenden Varianten, könnte auf eine sterische Hinderung, bedingt durch das C-terminal an Tim10 fusionierte HA-Epitop hindeuten. Eine konzentrationsabhängige Bindung des bispezifischen Konstrukts Tim10N-AHNP/Tim9C-P-4 an den ErbB2-Rezeptor und an VEGFR-2 konnte somit gezeigt werden.

## 4. Ergebnisse



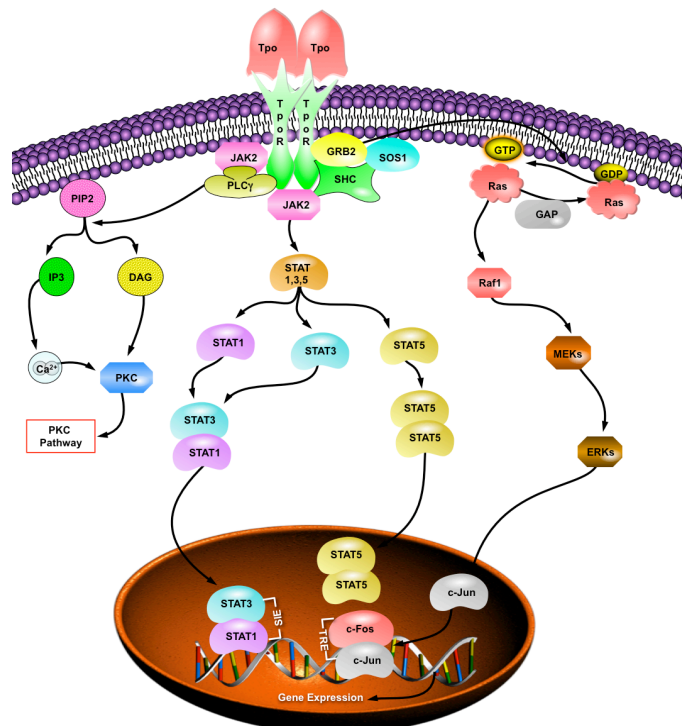
**Abb. 4.2.8:** Bindungsanalyse VEGFR-2-bindender und ErbB2-Rezeptor-bindender Tim10/Tim9-Komplexe. **A:** Monospezifischer Tim10N/Tim9C-P-4-Komplex, **B:** Monospezifischer Tim10N-AHNP/Tim9C-Komplex, **C:** Bispezifischer Tim10N-AHNP/Tim9C-P-4-Komplex (Bindung an ErbB2-Rezeptor) und **D:** Bispezifischer Tim10N-AHNP/Tim9C-P-4-Komplex (Bindung an VEGFR2-Rezeptor).

Da es sich bei den bisher untersuchten Bindemolekülen um pseudozyklische, also über eine Disulfidbrücke zyklisierte Peptide handelt, wurde im nächsten Abschnitt die Oligomerisierung eines hinsichtlich seiner Faltung komplexen Mikroproteins untersucht.

### 4.2.3. Untersuchungen zur Oligomerisierung von Mikroproteinen

Für die Analyse der Oligomerisierung komplexer Bindeproteine über den mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplex wurde die Klasse der Cystin-Knoten Mikroproteine verwendet. Cystin-Knoten Mikroproteine sind kompakte, ca. 26-48 Aminosäuren große Proteine deren Hauptfaltungsmotif ein Cystin-Knoten ist. Dieses Faltungsmotif zeichnet sich durch einen Ring aus zwei Disulfidbrücken aus, welcher von einer dritten Disulfidbrücke durchzogen ist [112]. Diese geordnete dreidimensionale Struktur verleiht den Mikroproteinen eine hohe Stabilität zum Beispiel gegenüber proteolytischen Verdau und hohen Temperaturen [113]. Daher sind Cystin-Knoten Mikroproteine für die molekulare Wirkstoffforschung von besonderem Interesse. Neben der klinischen Etablierung natürlich vorkommender Mikroproteinen wurden auch eine Reihe neu funktionalisierter Varianten generiert. Darunter ist eine Variante, welche den Thrombopoietin-Rezeptor (TPOR, cMpl) binden kann. Das auf den Trypsin Inhibitor EETI-II aus *Ecballium elaterium* basierende Mikroprotein wurde mit einem TPOR-bindenden Peptid (AF12505, [114]) funktionalisiert (siehe Abschnitt 4.1.1). Weiterhin wird dieses Mikroprotein als ET-TP-020 bezeichnet. In seiner monomeren Form konnte eine antagonistische [87] und als Dimer eine agonistische Wirkung gegenüber rekombinanten humanen Thrombopoietin (rhTPO) gezeigt werden [19]. Thrombopoietin induziert die Differenzierung von Stammzellen zu Megakaryozyten-Vorläufern und stimuliert das Wachstum und die Differenzierung von Megakaryozyten zu Thrombozyten. Die Signaltransduktion erfolgt dabei über rezeptorassoziierte Janus-Kinasen, welche über STAT3 und STAT5 die Aktivierung TPOR-regulierter Gene in Zellkern vermittelt. Neben der Aktivierung des STAT-Signaltransduktionsweges, induziert TPO auch den Phosphoinositid-3-Kinase- und den Ras-Signalweg. Die wesentliche Rolle des TPO bei der Thrombopoiese macht es zu einem Interessanten Zielmolekül für die molekulare Wirkstoffforschung. Ein Schema der durch TPO induzierten Signaltransduktionskaskade ist in Abbildung 4.2.9 dargestellt. Das

Mikroprotein ET-TP-020 ist damit prädestiniert zur Modulation von Krankheiten, welche sowohl auf dem Mangel (Thrombozytopenie) als auch auf eine erhöhte Anzahl an Thrombozyten (Thrombozytose) basieren. In diesem Abschnitt sollte nun das Mikroprotein ET-TP-020 über den mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplex oligomerisiert werden, die Bindung an und die Wirkung auf den TPO-Rezeptor *in vitro* nachgewiesen werden.

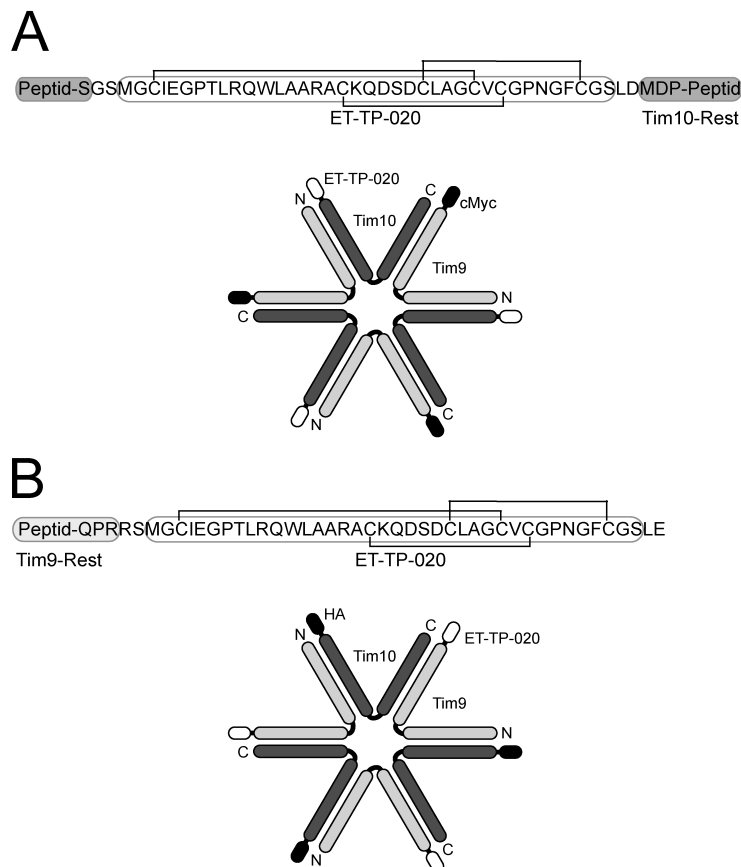


**Abb. 4.2.9:** Schematische Darstellung der durch Thrombopoietin induzierten Signaltransduktionskaskade. Modifiziert nach [www.proteinlounge.com](http://www.proteinlounge.com).

### 4.2.3.1. Konzeption, Klonierung und Expression der funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe

Die Oligomerisierung des Mikroproteins ET-TP-020 erfolgte sowohl über den N-Terminus der Tim10-Untereinheit als auch über den C-Terminus der Tim9-Untereinheit. Wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, könnte die Fusion an den N- oder C-Terminus eine Einflussnahme auf die räumliche Nähe der oligomerisierten Proteine zueinander ermöglichen. Dies könnte im späteren Modellversuch eine Einflussnahme auf die Aktivierung oder Inhibition des TPO-Rezeptors nehmen. Eine Übersicht über den Sequenzkontext und ein Schema der Lokalisierung des Mikroproteins ET-TP-020 ist in Abbildung 4.2.10 dargestellt.

Für die Klonierung wurde zunächst die kodierende Sequenz für das ET-TP-020-Gen amplifiziert (3.2.9.). Dies erfolgte unter der Verwendung der Oligonukleotide ET-TP-020\_BglII\_up und ET-TP-020\_XhoI\_lo und dem Plasmid pSE-ET-TP-020 als Matritze. Das PCR-Produkt wurde mit den Enzymen *Bgl*II und *Xho*I restrigiert (3.2.7.). Der Empfängervektor pETDuet-1-Tim10N Tim9C wurde für die N-terminale Fusion an Tim10 mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sal*I und für die C-terminale Fusion an die Tim9-Untereinheit mit den Enzymen *Bgl*II und *Xho*I geschnitten (3.2.7.). Die so vorbereiteten Edukte wurden zur Ligation (3.2.8.) eingesetzt und elektrokompente *E. coli*-Zellen des Stamms Top10 mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Sequenzierung vermeintlich positiver Klone erfolgte für die N-terminale Fusion an die Tim10-Untereinheit mit dem Oligonukleotid T7prom-Bsu15I-up und für die C-terminale Fusion an die Tim9-Untereinheit mit dem Oligonukleotid T7-Terminator-pET1.



**Abb. 4.2.10:** Schematische Darstellung der funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe. **A:** Tim10N-ET-TP-020/Tim9C. **B:** Tim10N/Tim9C-ET-TP-020.

Die Expression und Reinigung der Varianten erfolgte wie in Abschnitt 4.1.3 beschrieben in je 1 L LB-Medium. Eine Übersicht über die durchschnittlichen

#### 4. Ergebnisse

Ausbeuten an Fusionsprotein aus 1 L Zellkultur einer OD<sub>600</sub> von 0,5 ist in Tabelle 4.2.5 angegeben.

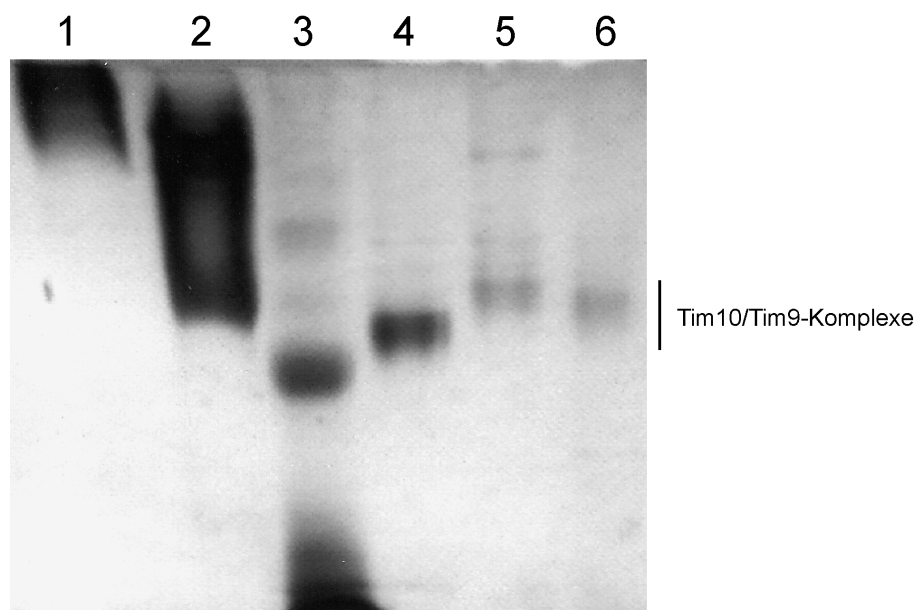
**Tabelle 4.2.5:** Ausbeuten der monospezifischen TPOR-bindenden Tim10/Tim9-Komplexe.

Protein	Peptidsequenz <sup>a</sup>	M <sub>r</sub> <sup>b</sup>	Ausbeute <sup>b</sup> (mg)
Tim10N-ET-TP-020/Tim9C	QSGSMGCIEGPTLRQWLAARACKQDSDCLE AGCVCGPNGFCGSLDMD PRRSEQKLISEEDLLE*	17217 (Tim10N-ET-TP-020) 12157 (Tim9C)	0,2
Tim10N/Tim9C-ET-TP-020	QSGSFCDGIFYACYMDVVDMDE PRSMGCIEGPTLRQWLAARACKQDSDCLE GCVCGPNGFCGS*	14283 (Tim10N) 14754 (Tim9C-ET-TP-020)	0,8

<sup>a</sup>: Aminosäuresequenz der funktionalisierten Bereiche, zur nativen Untereinheit veränderte Aminosäuren sind hervorgehoben. **Fett:** tag zur Detektion, Unterstrichen: Aminosäuren die durch Restriktionsschnittstellen hinzugefügt wurden.

<sup>b</sup>: Die Ausbeute bezieht sich auf je 1 L Kulturmedium, normiert auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5.

Die Ausbeute an mit ET-TP-020-funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplex liegt mit 0,2-0,8 mg im Bereich der Tim10/Tim9-Komplexe, welche mit pseudozyklischen Peptiden funktionalisiert wurden. Durch C-terminal Fusion an die Tim9-Untereinheit stieg die Ausbeute um das 3-fache im Vergleich zu der N-terminalen Fusion an der Tim10-Untereinheit an. Die Untersuchung der korrekten Hexamerisierung des funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexes erfolgte durch BN-PAGE (3.3.9., Abbildung 4.2.11).



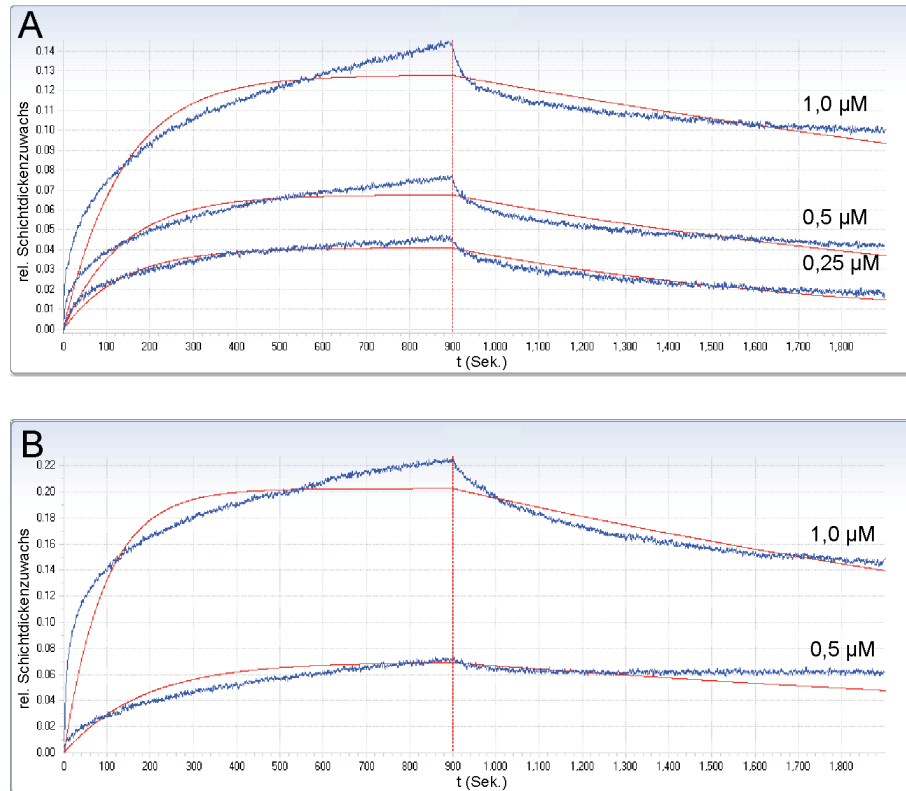
**Abb. 4.2.11:** BN-PAGE der funktionalisierten cMpl-bindenden Tim10/Tim9-Komplexe. 1: γ-Globulin aus dem Schwein (M<sub>r</sub>: 150000), 2: Conalbumin (M<sub>r</sub>: 74000), 3: Ovalbumin (M<sub>r</sub>: 43000), 4: Tim10N/Tim9C, 5: Tim10N-ET-TP-020/Tim9C 6: Tim10N/Tim9C-ET-TP-020.

Auf jeder Spur der BN-PAGE konnte eine distinkte Bande erwarteter Größe detektiert werden. Zusätzlich konnten oberhalb dieser Banden schwache Banden detektiert werden. Da diese Banden auch bei der zuvor analysierten Variante Tim10N/Tim9C nachgewiesen werden konnten, wurde an dieser Stelle von gelspezifischen Artefakten oder leichteren Verunreinigungen ausgegangen. Bei der Variante Tim10N-ET-TP-020/Tim9C (Spur 5, Abbildung 4.2.11) konnte eine weitere Bande im Bereich unterhalb der Bande des  $\gamma$ -Globulin-Längenstandards detektiert werden. Nachdem die Hexamerisierung der Mikroprotein-funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe gezeigt werden konnte, wurde weiterhin die Bindung an den TPO-Rezeptor untersucht.

### 4.2.3.2 Bindungsuntersuchungen an den TPO-Rezeptor

Zur Untersuchung der Bindung der Varianten Tim10N-ET-TP-020/Tim9C und Tim10N/Tim9C-ET-TP-020 an den TPO-Rezeptor wurde der humane TPO-Rezeptor (R&D-Systems®, Minneapolis, U.S.A.) an aminoreaktive Sensoren gekoppelt (3.3.11.). Als Negativkontrolle wurde die Variante Tim10/Tim9C mitgeführt. Abbildung 4.2.12 zeigt die Auswertung der Biolayer-Interferometrie-Messung. In blau sind die gemessenen Assoziationen und Dissoziationen gezeigt und in rot die jeweilige Angleichungskurve. Die Auswertung der Assoziations- und Dissoziationskurven erfolgte mit dem fortéBIO Analyseprogramm (3.3.11., Tabelle 4.2.6). Die Messpunkte der Negativkontrolle wurden von den Rohdaten der Konzentrationsreihe abgezogen. Für beide Varianten konnte eine konzentrationsabhängige Bindung an den rhTPOR gezeigt werden. Die apparente  $K_d$  lag sowohl für die C-terminal fusionierte als auch für die N-terminal fusionierte ET-TP-020-Variante im zweistelligen nanomolaren Bereich. Die starke Abweichung des Modells von den Messwerten weisen darauf hin, dass ein komplexer multimerer Bindungsmodus vorliegt. Die Validität dieser Daten wird in Abschnitt 5.2.3. diskutiert. Da die Ermittlung der Dissoziationskonstante des monomeren ET-TP-020 gegen den humanen Thrombopoietinrezeptor bisher noch nicht erfolgt ist, bleibt ein Vergleich mit den Literaturwerten aus.

## 4. Ergebnisse



**Abb. 4.2.12:** Bindungsanalyse cMpl-bindender Tim10/Tim9-Komplexe. **A:** Tim10N-ET-TP-020/Tim9C, **B:** Tim10N/Tim9C-ET-TP-020.

**Tabelle 4.2.6:** Ermittelte Dissoziationskonstanten der funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe.

Protein	Rezeptor	Sensor	Meßpunkte (nM)	X <sup>2</sup> a	R <sup>2</sup> b	K <sub>d</sub> <sup>c</sup> (nM)	K <sub>d</sub> <sup>d</sup> (nM)
Tim10N-ET-TP-020 /Tim9C	humaner TPOR	aminoreaktiv	250	0,01	0,93	41	43
			500	0,03	0,88	44	
			1000	0,10	0,86	44	
Tim10N/Tim9C-ET-TP-020	humaner TPOR	aminoreaktiv	500	0,02	0,95	11	24
			1000	0,29	0,82	36	

a: Summe der quadratischen Abweichungen der Angleichskurve von der gemessenen Assoziation und Dissoziation.

b: Bestimmtheitsmaß der Angleichskurve.

c: apparente Dissoziationskonstante, bestimmt nach 1:1 Langmuir-Modell und *local fitting*.

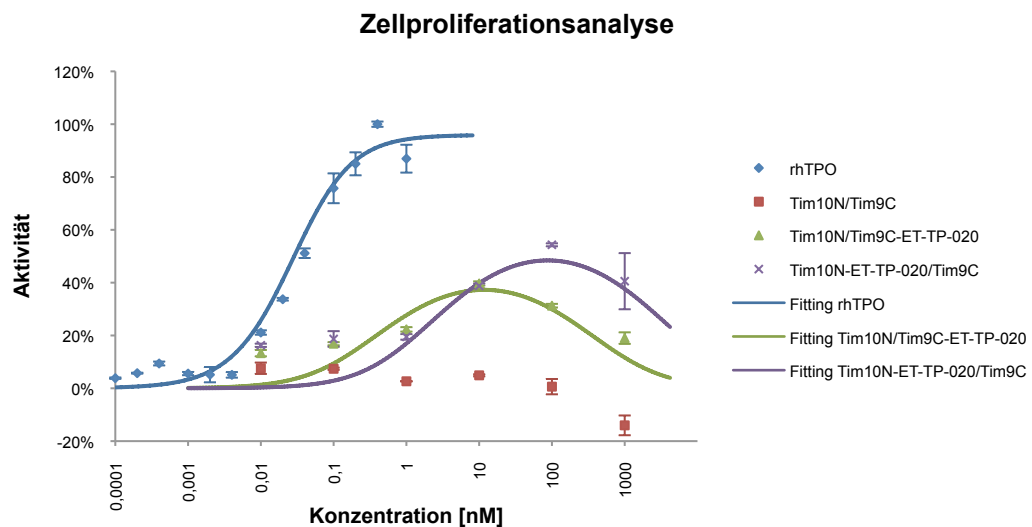
d: Mittelwert der errechneten apparenten K<sub>d</sub>.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die mit ET-TP-020 funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe konzentrationsabhängig und spezifisch an den humanen TPO-Rezeptor binden, sollte nun in einem weiteren Schritt die Modulation des Rezeptors *in vivo* analysiert werden. Dafür wurde die Wirkung der Varianten auf die humane Zelllinie M-07e untersucht.



### 4.2.3.3 Untersuchungen zur Induktion der Proliferation von M-07e-Zellen

Um den Einfluss der generierten ET-TP-020 Varianten auf den TPO-Rezeptor zu untersuchen, wurde Zellproliferationsassay verwendet [88]. Dabei werden auf rekombinanten humanen TPO (rhTPO) konditionierte M-07e-Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen über einen festen Zeitraum inkubiert und die Zellproliferation mit einem MTS-basierten Zelltiterrassay bestimmt. Mit dem Assay kann sowohl die agonistische, als auch mittels einer Koinkubation mit rhTPO die antagonistische Aktivität der zu untersuchenden Substanzen ermittelt werden. In dieser Versuchsreihe wurden zunächst auf rhTPO konditionierte M-07e-Zellen mit einer Konzentrationsreihe an funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe über 72 h inkubiert und die Zellproliferation mit dem *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega, Mannheim, 3.5.4.) bestimmt. Als Negativkontrolle wurde das Konstrukt Tim10N/Tim9C mitgeführt. Die Messwerte wurden mit einer Konzentrationsreihe an rhTPO verglichen (Abbildung 4.2.13).



**Abb. 4.2.13:** Analyse der Induktion der Zellproliferation bei der TPO-abhängigen Zelllinie M-07e. Je 50000 Zellen wurden in parallelen Ansätzen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Tim10N/Tim9C, Tim10N/Tim9C-ET-TP-020, Tim10N-ET-TP-020/Tim9C oder rekombinanten humanen TPO über 72 h stimuliert. Die Zellproliferation wurde anschließend mittels eines MTS-basierten Assays nach 3.5.4. bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Aktivität in Prozent, normiert auf 100% Aktivität des rhTPO. Die Fehlerbalken entsprechen der zugehörigen Standardabweichung. Das *Fitting* erfolgte durch ein sigmoidales Modell (rhTPO) und durch ein Modell nach Perelson und DeLisi (Tim10N/Tim9C-ET-TP-020, Tim10N-ET-TP-020/Tim9C) [85]. Das *Fitting* wurden von Dr. Sebastian Krause (Invigate GmbH, Jena) berechnet.

Die Darstellung der Messwerte erfolgte mit dem Programm Excel (Microsoft, Redmond, USA). Das Berechnen der Angleichungskurven (*Fitting*) erfolgte durch Dr. Sebastian Krause (Invigate GmbH, Jena). Das Diagramm in Abbildung 4.2.13 zeigt die optische Dichte der Zelltiter-Lösung bei 485 nm in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Testsubstanzen. Bei beiden Varianten konnte eine Stimulation der Zellproliferation der M-07e-Zellen und damit eine Aktivierung des TPO-Rezeptors gezeigt werden. Jedoch konnte mit der Variante Tim10N-ET-TP-020/Tim9C nur ca. 48 % der maximalen Aktivität des rhTPO erzielt werden, bei der Variante Tim10N/Tim9C-ET-TP-020 nur ca. 37 % (siehe Tabelle 4.2.7).

**Tabelle 4.2.7:** Vergleich der  $EC_{50}$  und der maximalen Aktivität mit Literaturwerten eines dimeren ET-TP-020 [19]

Konstrukt	$EC_{50}$ (nM)	maximale Aktivität <sup>a</sup>
rhTPO	0,0331 <sup>b</sup>	100%
Tim10N-ET-TP-020/Tim9C	2,01 <sup>c</sup>	48%
Tim10N/Tim9C-ET-TP-020	0,33 <sup>c</sup>	37%
dimeres ET-TP-020 aus [19]	1,6	110%
rhTPO aus [19]	0,16	100%

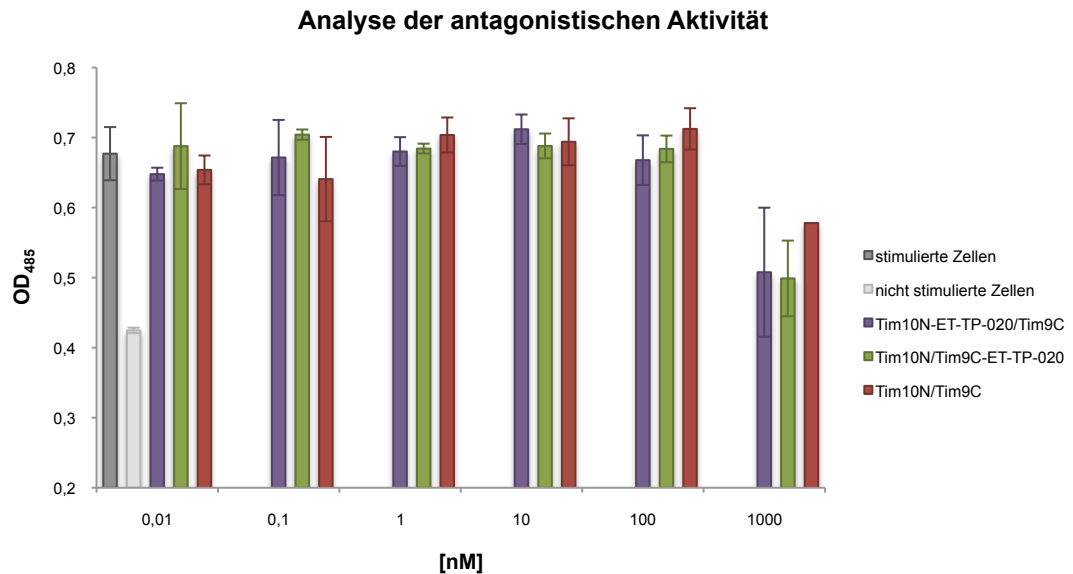
<sup>a</sup>maximale Aktivität von rhTPO in den jeweiligen Zellproliferationsassays als 100% definiert.

<sup>b</sup>Berechnung der  $EC_{50}$ -Werte anhand eines sigmoidalen Modells, durchgeführt von Dr. Sebastian Krause (Invigate GmbH, Jena).

<sup>c</sup>Berechnung der  $EC_{50}$ -Werte anhand eines Modells nach Perelson und DeLisi [85], durchgeführt von Sebastian Krause (Invigate GmbH, Jena).

Die ermittelten  $EC_{50}$ -Werte der untersuchten Tim10/Tim9-Komplexe sind um den Faktor 10 bis 60 geringer als bei dem rhTPO. Ein in der Literatur beschriebenes Dimer des ET-TP-020 Mikroproteins zeigte einen um den Faktor 10 schlechteren  $EC_{50}$  Wert, erreichte aber die maximale Aktivität des rhTPO.

Die beiden Varianten des über den mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplex trimerisierten Mikroproteins ET-TP-020 wurden weiterhin auf eine antagonistische Aktivität hin untersucht. Dafür wurde jeweils eine Konzentrationsreihe der funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe mit jeweils 1 nM rhTPO in Endkonzentration über 72 h co-inkubiert. Die Zellproliferation wurde wie oben beschrieben bestimmt und mit Zellen verglichen, die mit und ohne rhTPO inkubiert wurden. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Excel (Microsoft, Redmond, USA, 3.5.4., Abbildung 4.2.14).

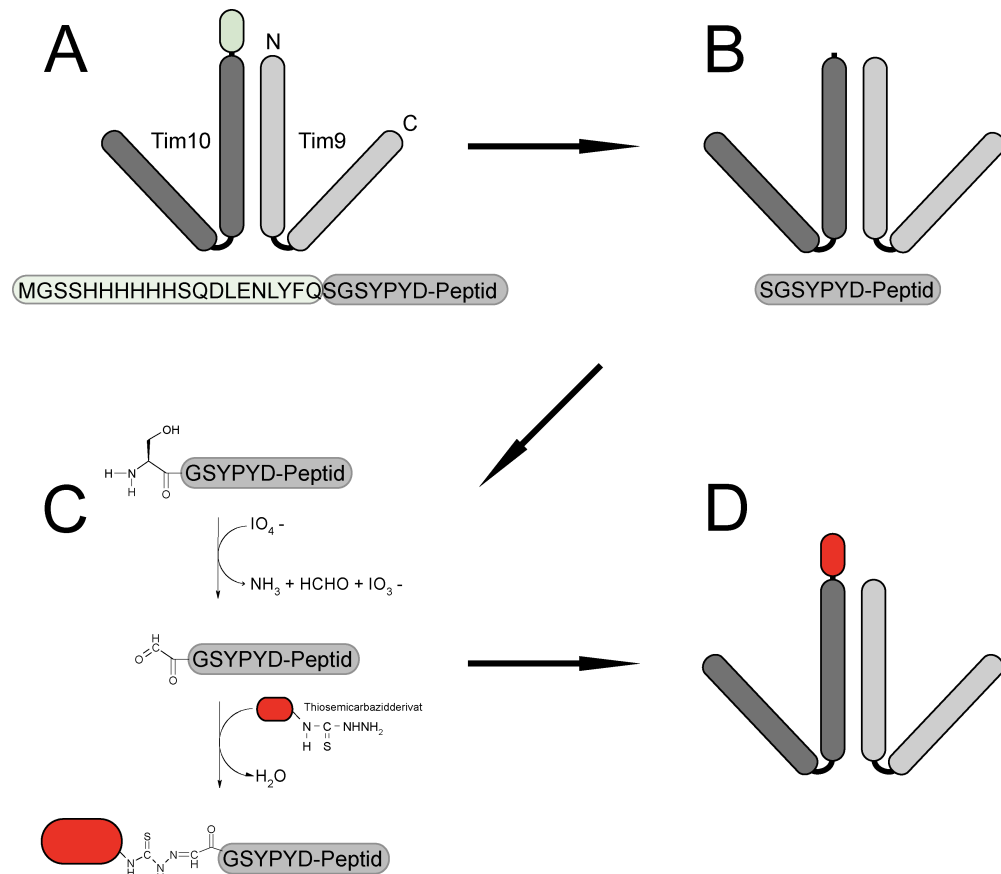


**Abb. 4.2.14:** Analyse der Inhibition der Zellproliferation bei der TPO-abhängigen Zelllinie M-07e. Je 25000 Zellen wurden in parallelen Ansätzen mit 5 nM rhTPO versetzt und nach 2 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit unterschiedlichen Konzentrationen von Tim10N/Tim9C, Tim10N/Tim9C-ET-TP-020 oder Tim10N-ET-TP-020/Tim9C über 72 h weiter inkubiert. Als Kontrollen wurden Zellen mit 5 nM rhTPO (stimuliert) und ohne Mitogen (nicht stimuliert) inkubiert. Die Zellproliferation wurde anschließend mittels eines MTS-basierten Assays nach 3.5.4. bestimmt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte der OD<sub>485</sub> von Doppelbestimmungen, die Fehlerbalken entsprechen der zugehörigen Standardabweichungen.

Abbildung 4.2.14 zeigt die gemessene optische Dichte der Zelltiter-Lösung bei 485 nm in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexen. Als Negativkontrolle wurde das Konstrukt Tim10N/Tim9C mitgeführt. Bis zu einer molaren Konzentration von 100 nM lag die Zellproliferation der untersuchten Konstrukte in dem Bereich von ausschließlich mit rhTPO inkubierten Zellen (stimulierte Zellen). Bei der höchsten eingesetzten molaren Konzentration an funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexen wurde ein Rückgang der Proliferation um ca. 25 % beobachtet. Auch bei dem Konstrukt Tim10N/Tim9C trat ein Rückgang um ca. 15% auf. Dies entspricht den Beobachtungen bei der Untersuchung der agonistischen Aktivität der funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe. Auch hier war die Zellproliferation bei einer molaren Konzentration von 1000 nM rückläufig. Da dieser Rückgang jedoch auch bei der Negativkontrolle nachweisbar war, kann nicht von einer spezifischen Inhibition des TPOR ausgegangen werden.

### 4.3. Spezifische chemische Konjugation funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe

Bifunktionale Moleküle sind in der Biotechnologie und in der molekularen Medizin weit verbreitet. Dazu zählen z.B. Konjugate aus Antikörpern und Chromophoren oder Enzymen, wie sie bei Immunfärbungen oder bei ELISA-Analysen zum Einsatz kommen. Die Möglichkeit, eine rekombinant hergestellte Oligomerisierungsdomäne chemisch zu modifizieren, birgt somit viele Vorteile. So wäre nicht nur eine Verwendung in den oben beschriebenen Beispielen möglich, sondern auch die Inkorporation synthetisch hergestellter Peptid mit nicht natürlichen Aminosäuren. Für die Verwendung in der molekularen Medizin ist dabei eine spezifische Konjugation besonders wichtig, da die biologische Aktivität eines Moleküls vorwiegend von der Valenz abhängt. Ahn und Kollegen haben eine Methode beschrieben, welche die Markierung oxidierte Proteine mit Thiosemicarbazid- und Hydrazidderivaten ermöglicht [115]. Für eine gerichtete Konjugation wäre also eine spezifische Oxidierung des Tim10/Tim9-Komplexes nötig. Dafür bietet sich ein N-terminales Serin an, welches durch das Abspalten des N-terminalen Polyhistidin-*tags* durch eine TEV-Protease erhalten wird. Somit wäre es möglich, durch Oxidation des N-terminalen Serins zu einem Aldehyd, den Tim10/Tim9-Komplex spezifisch mit einem Thiosemicarbazid- oder Hydrazidderivat zu konjugieren [115]. Ein mögliches Schema dieser spezifischen Konjugation ist in Abbildung 4.3.1 dargestellt. In diesem Abschnitt soll überprüft werden, ob die chemische Modifikation des Tim10/Tim9-Komplexes unter Einhaltung der hexameren Struktur möglich ist. Dafür wird beispielhaft die in Kapitel 4.2.4 beschriebene cMpl-bindende ET-TP-020-Variante des Tim10/Tim9-Komplexes (Tim10N/Tim9C-ET-TP-020) mit einem Fluorescein-5-Thiosemicarbazid konjugiert.



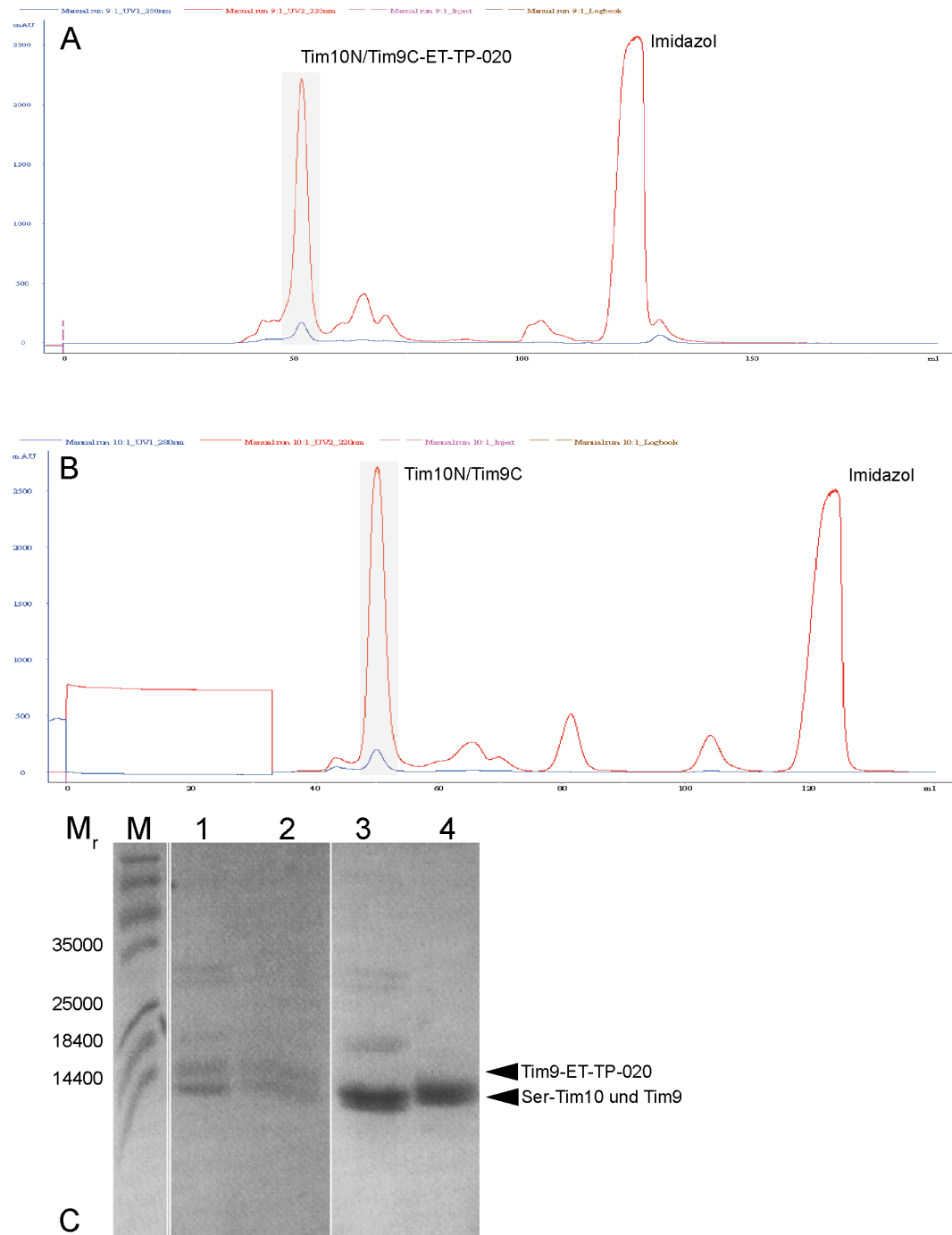
**Abbildung 4.3.1:** Schematische Darstellung der Konjugation von Thiosemicarbazidderivaten an die Tim10-Untereinheit. **A:** Native Tim10- und Tim9-Untereinheit. Die Tim10-Untereinheit ist dunkelgrau dargestellt. Die Tim9-Untereinheit ist hellgrau dargestellt. Der Polyhistidin-tag und die TEV-Protease Erkennungssequenz sind grün dargestellt. Die Aminosäuresequenz zeigt den N-terminalen Bereich an der Tim10-Untereinheit. **B:** Tim10- und Tim9-Untereinheit nach der proteolytischen Spaltung mit TEV-Protease. **C:** Schematische Darstellung der Oxidation des N-terminalen Serins zu einer Aldehydfunktion und der Konjugation eines Thiosemicarbazid-derivats unter Ausbildung einer Schiff'schen Base. **D:** Fertiges Konjugat.

#### 4.3.1. Herstellung von Tim10/Tim9-Komplex-Varianten mit N-terminalen Serin

Für die Konjugation des Fluorescein-5-Thiosemicarbazids wurden die Varianten Tim10N/Tim9C und Tim10N/Tim9C-ET-TP-020 verwendet. Die rekombinante Produktion der Varianten erfolgte wie in 3.3.3. beschrieben. Die Tim10/Tim9-Komplexe wurden mittels Nickel-Affinitätschromatographie aus dem Rohextrakt isoliert (3.4.2.) und die einzelnen Fraktionen zur Überprüfung auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Fraktionen, welche das gewünschte Protein enthielten, wurden vereint und der N-terminale Polyhistidin-tag durch eine proteolytische Spaltung mit der Protease des *tabacco etch virus* (TEV, TEV-Protease) vom Tim10/Tim9-Komplex separiert (3.3.7.). Die TEV-Protease spaltet in der Erkennungssequenz ENLYFQS/G [70]. Die letzte Aminosäure kann dabei alternierend ein Serin oder Glycin sein, wobei die Spaltung spezifisch nach dem

Glutamin erfolgt. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Erkennungssequenz (ENLYFQS) erhält man somit ein N-terminales Serin am Konjugationspartner. Die so gespaltenen Konstrukte werden wie folgt bezeichnet: Ser-Tim10N/Tim9C und Ser-Tim10N/Tim9C-ET-TP-020. Zur weiteren Isolierung der Tim10/Tim9-Komplexe wurden die Ansätze auf ein Volumen von 1 mL konzentriert (3.3.5.) und mittels präparativer Gelfiltrationschromatographie gereinigt (3.4.3., Abbildung 4.3.2 A, B). Die funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe eluieren nach ca. 50 Minuten und wurden separat aufgefangen. Ein zweiter *Peak* bei einer Retentionszeit von ca. 125 Minuten enthielt kein weiteres Protein (Daten nicht gezeigt), mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich dabei um Verunreinigungen, die durch das zur Elution der IMAC eingesetzte Imidazol hervorgerufen werden. Zur Kontrolle der erfolgreichen Reinigung wurden die einzelnen Fraktionen auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (3.3.8., Abbildung 4.3.2 C). In beiden Fällen könnte jeweils zwei spezifische Banden detektiert werden, die der Größe der Tim9- und der proteolytisch gespaltenen Tim10-Untereinheit entsprechen. Auf der SDS-PAGE konnten keine weiteren Verunreinigungen beobachtet werden. Nachdem in diesem Abschnitt gereinigte, funktionalisierte Tim10/Tim9-Komplexe mit N-terminalen Serin hergestellt wurden, konnte mit der chemischen Kopplung des Fluorescein-5-Thiosemicarbazids fortgesetzt werden.

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 4.3.2:** Isolierung von funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexen mit N-terminalen Serin. **A:** Gelfiltrationschromatographie der Variante Ser-Tim10N/Tim9C-ET-TP-020. Der grau hinterlegte Bereich wurde separat gesammelt. **B:** Gelfiltrationschromatographie der Variante Ser-Tim10N/Tim9C. Der grau hinterlegte Bereich wurde separat gesammelt. **C:** SDS-PAGE der isolierten Varianten. M: Fermentas® *Molecular Weight Marker*. 1: Ser-Tim10N/Tim9C-ET-TP-020 vor der Chromatographie, 2: Isolierter Ser-Tim10N/Tim9C-ET-TP-020 Komplex. 3: Ser-Tim10N/Tim9C-ET-TP-020 vor der Chromatographie, 4: Isolierter Ser-Tim10N/Tim9C-ET-TP-020 Komplex.

### 4.3.2. Konjugation von Fluorescein-5-Thiosemicarbazid

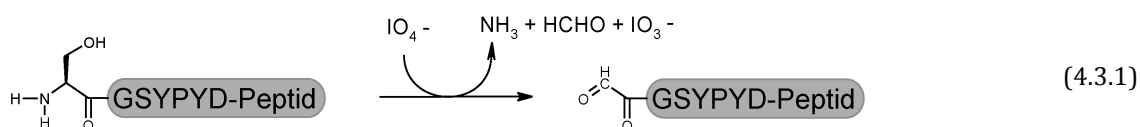
Zunächst wurde die Konzentration der funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe photometrisch bestimmt (3.3.6., Tabelle 4.3.1).

#### 4. Ergebnisse

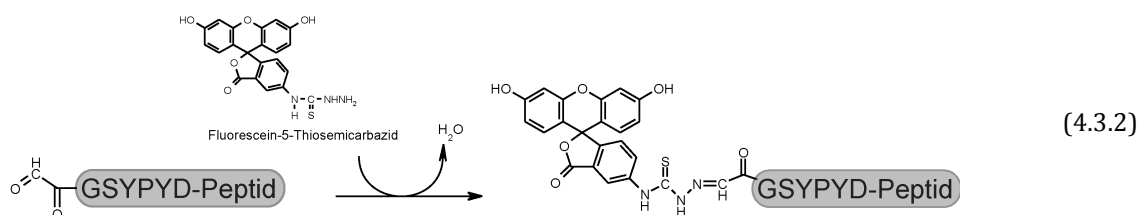
**Tabelle 4.3.1:** Konzentration der eingesetzten Tim10/Tim9-Komplexe

Tim10/Tim9-Komplex	M <sub>r</sub>	OD <sub>280</sub>	Faktor	mg/mL	μM
Ser-Tim10N/Tim9C	72280	0,16	1,93	0,3088	4,27
Ser-Tim10N/Tim9CET-TP-020	80342	0,06	1,43	0,0852	1,06

Für die Konjugation wurden je 4 mL der Proteine eingesetzt. Dies entspricht bei der Variante Ser-Tim10N/Tim9C einer Stoffmenge von 17,08 nmol und bei der Variante Ser-Tim10N/Tim9C-ET-TP-020 einer Stoffmenge von 4,24 nmol. Die Proteine wurden mit dem 10-fachen molaren Überschuss an Natriumperiodat für 20 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Durch das Natriumperiodat werden die N-terminalen Serinreste am Tim10/Tim9-Komplex unter Abspaltung von Ammoniak und Formaldehyd zu einem Aldehydrest oxidiert (Reaktionsschema 4.3.1).



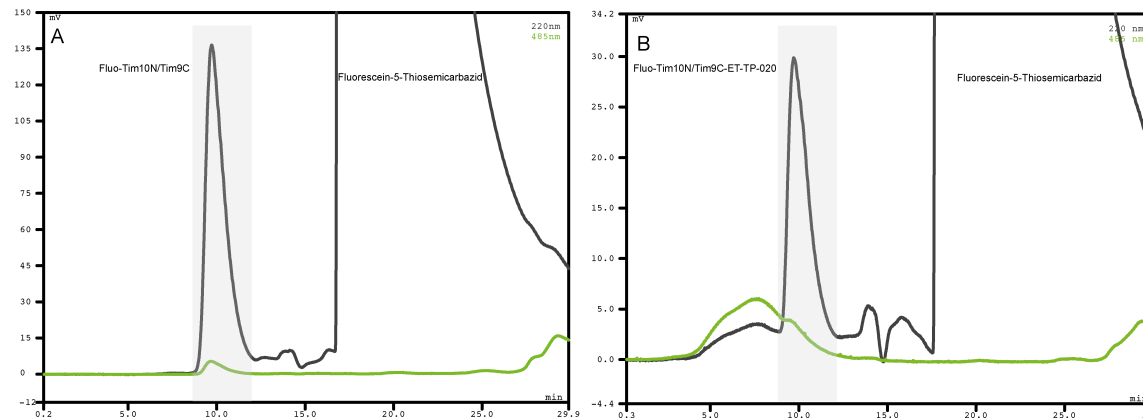
Zur Konjugation von Fluorescein-5-Thiosemicarbazid wurde das in 1/3 H<sub>2</sub>O und 2/3 DMF gelöste Chromophor in einem 20-fachen molaren Überschuss zugegeben und unter Lichtausschluß über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Bei diesem Schritt reagiert der Thiosemicarbazidrest unter Ausbildung einer Schiff'schen Base und Abspaltung von Wasser mit dem Aldehydrest an der Tim-Untereinheit (Reaktionsgleichung 4.3.2). Die Produkte dieser Reaktion werden mit Fluo-Tim10N/Tim9C und Fluo-Tim10N/Tim9C-ET-TP-020 bezeichnet.



Zur Kontrolle der Konjugation und zur Isolierung des Fluo-Tim10/Tim9-Komplexes aus der Reaktionslösung wurde der Ansatz konzentriert (3.3.5.) und präparativ durch Gelfiltrationschromatographie gereinigt. Für die präparative Reinigung wurde auf Grund der höheren Stabilität der Schiff'schen Base bei einem pH-Wert von 6,8 und der zu erwarten geringen Proteinkonzentration die



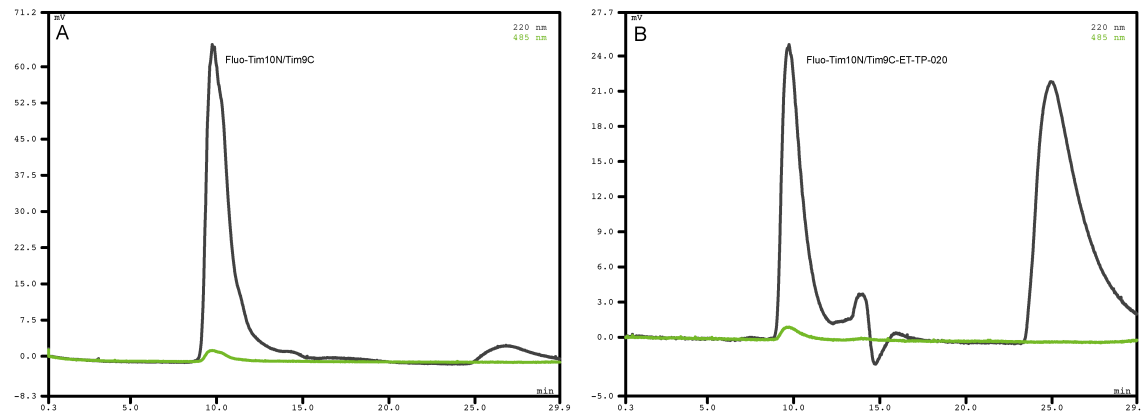
analytische Gelfiltrationschromatographie gewählt (3.4.3.). Parallel zur OD<sub>220</sub> wurde auch die Absorption bei  $\lambda = 485 \text{ nm}$  in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Bei dieser Wellenlänge absorbiert Fluorescein, somit kann eine Korrelation der Absorption von Peptidbindungen zu Fluorescein hergestellt werden (Abbildung 4.3.3).



**Abbildung 4.3.3:** Analytische Gelfiltrationschromatographie der Kopplung von Fluorescein-5-Thiosemicarbazid an funktionalisierte Tim10/Tim9-Komplexe. In grün ist die Absorption bei 485 nm und in grau die Absorption bei 220 nm aufgetragen. **A:** Chromatogramm der Variante Fluo-Tim10N/Tim9C. **B:** Chromatogramm der Variante Fluo-Tim10N/Tim9C-ET-TP-020.

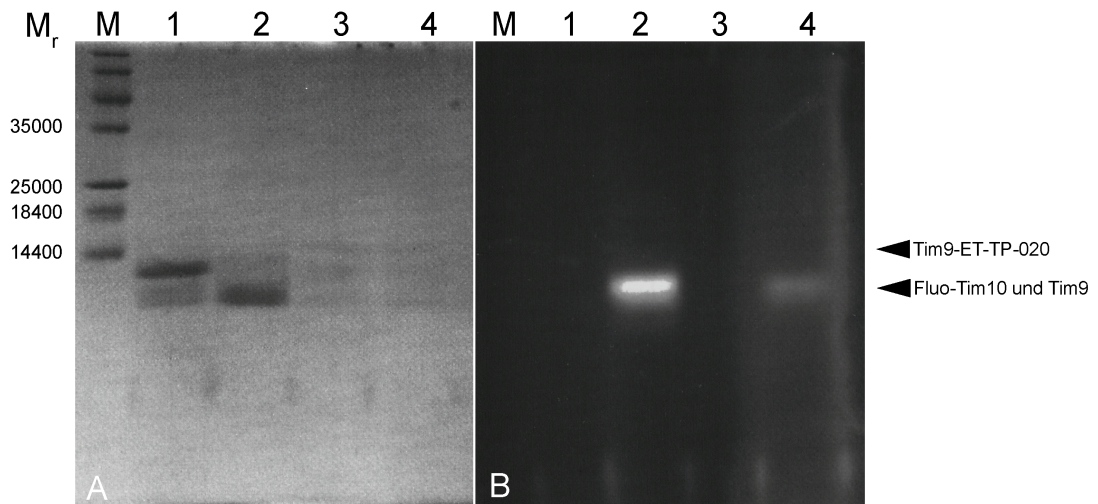
Beide Varianten eluierten nach ca. 10 Minuten. Es konnte sowohl eine Absorption bei 220 nm als auch bei 485 nm gemessen werden. Bei der Variante Fluo-Tim10N/Tim9C-ET-TP-020 wurde vor dem erwarteten *Peak* eine deutlich erhöhte Absorption bei 485 nm gemessen, welches auf eine hochmolekulare Aggregatbildung hindeutet. Zudem zeigte beide Varianten einen *Peak* ab ca. 17 Minuten Retentionszeit, welcher mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Verunreinigungen aus freien Fluorescein-5-Thiosemicarbazid zurückzuführen ist. Zur weiteren Analyse wurden daher die gereinigten Proben erneut durch Gelfiltrationschromatographie untersucht (Abbildung 4.3.4). Bei den gereinigten funktionalisierten Fluo-Tim10/Tim9-Komplexen wurde jeweils nur ein *Peak* detektiert, der eine Retentionszeit von ca. 10 min. aufwies, die einem hexameren Tim10/Tim9-Komplex entsprach. Zur weiteren Kontrolle wurde das gereinigte Konjugat auf eine 20 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (3.3.8.).

#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 4.3.4:** Gelfiltrationschromatographie der isolierten mit Fluorescein-konjugierten Tim10/Tim9-Komplexe. Die Absorption bei 220 nm ist in grau dargestellt. Die Absorption bei 485 nm ist in grün dargestellt. **A:** Variante Fluo-Tim10N Tim9C, **B:** Variante Fluo-Tim10N Tim9C-ET-TP-020.

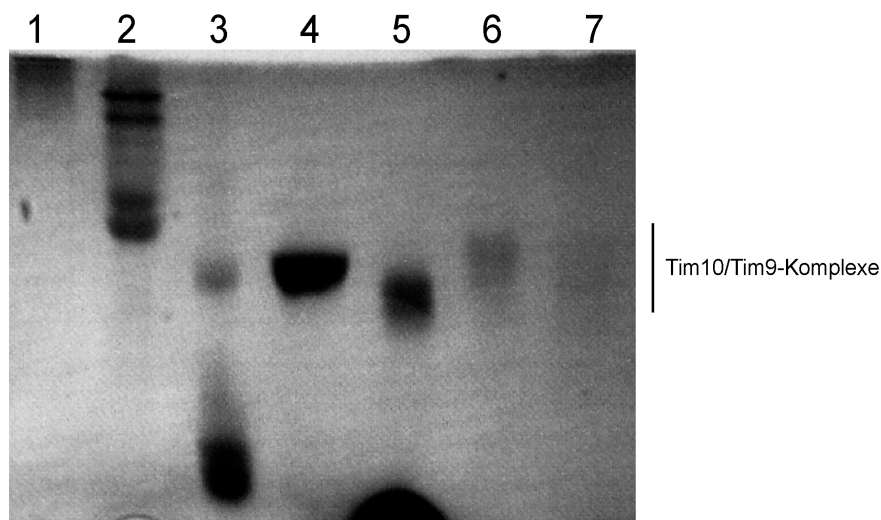
Um das Fluorescein nicht zu zerstören, wurden die in Probenpuffer aufgenommenen Proteine direkt, ohne Erhitzen auf 99 °C, auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde lichtgeschützt durchgeführt. Die Detektion der Proben erfolgte sowohl durch ultraviolettes Licht der Wellenlänge von 322 nm als auch mit Coomassie-Färbung (Abbildung 4.3.5).



**Abbildung 4.3.5:** SDS-PAGE der Fluorescein-Konjugation. M: Fermentas® *Molecular Weight Marker*. 1: Tim10N/Tim9C vor der Konjugation, 2: Isolierter Fluo-Tim10N/Tim9C Komplex. 3: Tim10N/Tim9C-ET-TP-020 vor der Konjugation, 4: Isolierter Fluo-Tim10N/Tim9C-ET-TP-020 Komplex. **A:** Coomassiefärbung, **B:** Detektion bei  $\lambda = 322$  nm.

Bei der Färbung mit Coomassie konnte bei jeder Spur mehrere Banden detektiert werden, jedoch hauptsächlich bei den erwarteten Größe unterhalb eines relativen Molekulargewichts von 14400. Die Detektion mit ultraviolettem Licht der Wellenlänge von 322 nm ergab je eine spezifische Bande auf der Höhe der Tim10N Bande. Zur weiteren Überprüfung der Einhaltung einer hexameren Struktur wurde

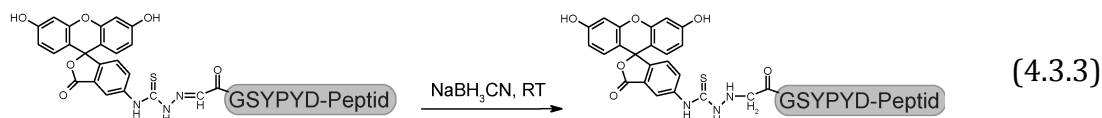
von den Proben vor und nach der Fluoresceinkonjugation eine Blau-native Gelelektrophorese durchgeführt (3.3.9., Abbildung 4.3.5).



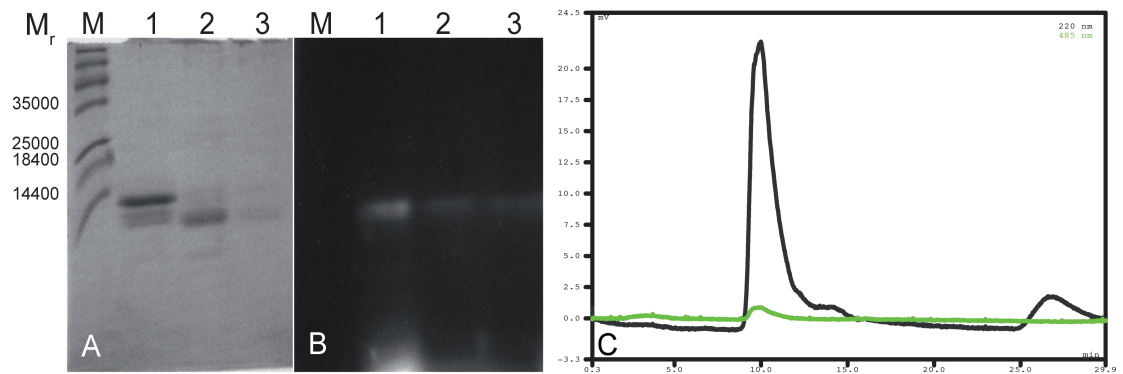
**Abb. 4.3.5:** Blau-native Polyacrylamidgelelektrophorese der Tim10/Tim9-Komplexe vor und nach der Fluoresceinkonjugation. 1:  $\gamma$ -Globulin vom Schwein, 2: Conalbumin, 3: Albumin aus Hühnereiweiß, 4: Tim10N Tim9C, 5: Fluo-Tim10N Tim9C, 6: Tim10N Tim9C-ET-TP-020, 7: Fluo-Tim10N Tim9C-ET-TP-020.

Wie auf den Spuren 4-7 zu erkennen ist, bildet auch der mit Fluorescein-konjugierte Tim10/Tim9-Komplex nur eine Proteinbande aus, mit einem apparenten Molekulargewicht, welches einem Hexamer entsprach.

Das gebildete Hydrazone ist nur bei saurem und neutralem pH stabil. Durch Reduktion der C=N Bindung mit Cyanoborhydrid kann ein stabiles Konjugat erhalten werden [23]. Dafür wurde das gereinigte Konjugat mit dem 10-fachen molaren Überschuss je Bindung an Natriumcyanoborhydrid für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gegen PBS dialysiert. Dabei wird die Schiff'sche Base zu einer Einfachbindung reduziert (Reaktionsschema 4.3.3).



Zur Kontrolle der Reduzierung wurde der Reaktionsansatz nach der Dialyse sowohl auf ein 20 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen (3.3.8., Abbildung 4.3.6 A+B), als auch einer analytische Gelfiltrationschromatographie unterzogen (3.4.3., Abbildung 4.3.6 C).



**Abb. 4.3.6:** SDS-Polyacrylamidelektrophorese der reduzierten funktionalisierten Tim10N/Tim9C-Komplexe. **A:** Coomassie-Färbung, **B:** Detektion bei  $\lambda = 322$  nm, **C:** Gelfiltrationschromatographie der reduzierten Fluo-Tim10N/Tim9C Variante. In schwarz ist die Absorption bei 220 nm dargestellt. In grün ist die Absorption bei 485 nm dargestellt.

Wie in Abbildung 4.3.6 A und B zu erkennen ist, wird durch die Reduzierung das Bandenschema im Vergleich zu der nicht reduzierten Variante nicht verändert. Die analytische Gelfiltrationschromatographie in Abbildung 4.3.6 C zeigt kein verändertes Elutionsverhalten des funktionalisierten Fluorescein-konjugierten und reduzierten Tim10/Tim9-Komplexes.

## 5. Diskussion und Ausblick

### 5.1. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war der Aufbau und die Etablierung eines Verfahrens zur Herstellung von homo- und heterooligomeren Proteinkomplexen auf der strukturellen Grundlage des mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplexes. Als Alternative zu bereits etablierten Konjugations- und Oligomerisierungsmethoden sollte die Oligomerisierungsdomäne folgenden Randbedingungen genügen (1) funktionalisierte Tim10/Tim9-Komplexe sollten durch eine einfache rekombinante Synthese zugänglich sein, (2) die Generierung bispezifischer Konjugate sollte möglich sein, (3) neben einfachen Peptiden sollten auch hinsichtlich ihrer Faltung komplexe Proteine oligomerisiert werden können, (4) die funktionalisierten Komplexe sollten pharmazeutisch relevante Rezeptoren binden oder modulieren können und (5) eine spezifische chemische Funktionalisierung des Tim10/Tim9-Komplexes unter Einhaltung der hexameren Struktur sollte möglich sein.

5.1.1. Aufbau eines universellen rekombinanten Syntheseverfahrens zur Bereitstellung funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe

#### Singuläre Expression funktionalisierter Tim10- und Tim9-Untereinheiten

Im Abschnitt 4.1. wurde zunächst die rekombinante Synthese funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe untersucht und ein universelles Syntheseverfahren aufgebaut. In der Literatur war die rekombinante Synthese von Tim10/Tim9-Komplexen durch getrennte Expression beider Untereinheiten in *E. coli* als Fusion an Glutathion-S-Transferase beschrieben [57, 58]. Diese Synthese war im Prinzip möglich, jedoch konnte nach der Abspaltung des GST-Anhängsels nur noch die Tim10-Untereinheit in löslicher Form gewonnen werden. Die Tim9-Untereinheit präzipitierte nach der Abspaltung des GST-Anhängsels und konnte somit singulär nicht isoliert werden [58]. Da für den Anwendungszweck die Oligomerisierung von Bindemolekülen im Vordergrund steht, wurde weiterhin die Expression mit fusionierten Bindeproteinen untersucht. Dafür wurden die hinsichtlich ihrer Faltung komplexen Cystin-Knotenmikroproteine ET-TP-020 und AG-TP-050 [19]

C-terminal an die Tim9-Untereinheit fusioniert. Die Expression erfolgte analog zu der nicht funktionalisierten Tim9-Untereinheit. Hierbei wurde beobachtet, dass die Proteine schon als Fusionsprotein mit GST-Anhängsel nach kurzer Zeit präzipitierten. Dies erfolgte vornehmlich, wenn die Proteine gegen physiologischen PBS-Puffer dialysiert wurden. Auch die Verwendung alternativer Fusionsproteine wie Thioredoxin, Maltose-Bindeprotein oder  $\beta$ -Laktamase, welche häufig in der rekombinanten Proteinsynthese als Fusionspartner eingesetzt wurden, um die Präzipitation von Einschlußkörpern zu verhindern [116-119], erbrachten keine höheren Ausbeuten löslichen Proteins (Daten nicht gezeigt). Ivanova und Kollegen haben ein Modell für die Assemblierung eines funktionalen Tim10/Tim9-Komplexes beschrieben (Abschnitt 1.2.2, Abbildung 1.7, [59]). Dabei gehen die Autoren davon aus, dass sich zunächst zwei Tim9-Untereinheiten zu einem Homodimer zusammenlagern, um erst in einem weiteren Schritt mit einer Tim10-Untereinheit ein Heterodimer zu bilden. Dies wird auch mit einem erhöhten Anteil an hydrophoben Aminosäureresten der Tim9-Untereinheit gegenüber der Tim10-Untereinheit erklärt. Durch die Veränderung der Ionenkonzentration nach dem Pufferwechsel zu physiologischen PBS-Puffer wurde somit vermutlich eine Aggregation verursacht. Eine biotechnologisch sinnvolle Produktion der Tim-Untereinheiten in solitärer Form ist somit nicht möglich. Daher wurde im Weiteren die in Luciano und Kollegen beschriebene bicistronische Expression untersucht [89].

### Bicistronische Expression funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe

Bei der bicistronischen Expression werden die beiden zu exprimierenden Gene getrennt durch eine Shine-Dalgarno-Sequenz unter der Kontrolle eines Promotors auf einen Vektor kodiert. Bei der Konstruktion der Vektoren für die bicistronische Expression wurde eine modifizierte Shine-Dalgarno-Sequenz verwendet, welche bei Skerra und Kollegen beschrieben ist [90]. Diese findet Anwendung zur rekombinanten Synthese von Antikörper  $F_{ab}$  Fragmenten und ermöglicht eine spätere Modifizierung mit Restriktionsschnittstellen. Die Expressionsstudien zeigten, dass die bicistronische Expression als GST-Fusion eine stabile Expression ermöglichte. Dabei konnten Ausbeute von durchschnittlich 1,9 - 4,4 mg Protein pro Liter Zellkultur normiert auf eine  $OD_{600}$  von 0,5 erreicht werden. Anhand von

Western-*Blot*analysen (Abb. 4.1.8) konnte gezeigt werden, dass es sich bei den isolierten Proteinen um die Tim9- und Tim10-Untereinheit handelt. Da bei der bicistronischen Expression nur die Tim10-Untereinheit mit einem Affinitätsanhängsel versehen ist, aber beide Untereinheiten durch eine einzelne Glutathion-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden konnten, zeigte dies eine Interaktion zwischen der Tim9- und Tim10-Untereinheit an. Die Western-*Blot*analyse zeigte jedoch auch mehrere Banden unterhalb der GST-Tim10-Fusion, welche mit einem spezifischen Antikörper gegen die Glutathion-S-Transferase detektiert werden konnten. Dies lässt auf einen Abbau oder einer unvollständigen Synthese der GST-Tim10-Fusion schließen.

Die weitere Untersuchung der Oligomerisierung erfolgte durch ein blau-natives Polyacrylamidgel (Abb. 4.1.9). Dabei wurden neben den bicistronisch exprimierten GST-Fusionen auch eine mit TEV-Protease gespaltene Variante und eine singuläre GST-Tim10 Fusion analysiert. Bis auf die Variante GST-Tim10 Tim9cMyc (Abb. 4.1.9) zeigte jede Probe einen Schmier an Protein und keine distinkte Bande. Dies lässt auf unspezifische Aggregation der Proteine schließen. Da auch die GST-Tim10 Fusion keine distinkte Bande aufwies und der Schmier nach Abspaltung des GST-Anhängsels abnahm, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit die Aggregation der Fusionsproteine mit der Aggregation des GST-Anhängsels begründet werden. Daher wurden zur weiteren Analyse der bicistronischen Expression Tim10/Tim9-Komplexe mit einem N-terminalen Polyhistidin-*tag* an der Tim10-Untereinheit ohne GST-Fusion produziert. Die Ausbeute der Varianten ohne GST-Anhängsel lag mit 1,7 bis 1,8 mg je Liter Zellkultur einer OD<sub>600</sub> von 0,5 auf einem ähnlichen Niveau, wie die GST-Fusionen (Tab. 4.1.2 und 4.1.3). Zudem konnte von einer Entfernung des Polyhistidin-*tags* und einer weiteren Reinigung abgesehen werden. Ein weiterer Faltungshelfer für die Produktion ist somit nicht notwendig. Eine Analyse der funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe durch BN-PAGE zeigte im Gegensatz zu dem vorherigen Ansatz eine distinkte Bande in der erwarteten Höhe für ein Tim10/Tim9-Heterohexamer (Abb. 4.1.12). Auch eine analytische Gelfiltration zeigte nur einen Hauptpeak mit einer ermittelten molekularen Masse von ca. 72000 bzw. 80000 im Vergleich zu der berechneten von 81500 bzw. 85000. Da bei der Kalibrierung der Gelfiltrationssäule hauptsächlich globuläre Proteine verwendet wurden, kann es zu Abweichungen bei der Berechnung des apparenten

Molekulargewichts führen. Aufgrund des erbrachten Nachweises, dass eine gleichzeitige Expression der Untereinheiten ohne weitere Faltungshelfer möglich ist, wurde zuletzt ein duales Expressionssystem untersucht.

### Duale Expression funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe

Das auf der pET-Vektorreihe basierende Expressionssystem pETDuet1 ermöglicht die Expression der Tim-Untereinheiten unter Kontrolle je eines T7-Promotors. Dabei ist die Tim10-Untereinheit N-terminal mit einem Polyhistidin-*tag* versehen. Eine Analyse der Expression und Reinigung der Untereinheiten durch SDS-PAGE zeigte noch weitere Verunreinigungen (Abb. 4.1.15), die durch eine präparative Gelfiltrationschromatographie entfernt werden konnten (Abb. 4.1.16). Die Analyse der Oligomerisierung durch eine blau-native PAGE zeigte jeweils nur eine distinkte Bande in erwarteter Höhe und keine weiteren monomeren Tim9- oder Tim10-Untereinheiten oder andere Oligomerisierungsprodukte des Tim10/Tim9-Komplexes. Obwohl bei den hier analysierten Konstrukten jeweils beide Untereinheiten funktionalisiert wurden, lag die Ausbeute mit 0,7 - 6,7 mg Protein je Liter Zellkultur einer OD<sub>600</sub> von 0,5 auf einem ähnlichen Niveau wie bei den Expressionen ohne Fusionspartner. Die Komplexe wurden weiterhin mittels Western-*Blot*analyse untersucht (Abb. 4.1.17). Beide Untereinheiten konnten indirekt über den HA-*tag* bzw. dem cMyc-*tag* detektiert werden (Abb. 4.1.17 B + C). Bei der Variante Tim10C/Tim9C konnte auf der Höhe des Molekulargewichts von 25000 und sehr schwach bei ca. 50000 auf dem mit Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgel eine Bande nachgewiesen werden (Abb. 4.1.17 A, Spur 2). Diese ließen sich jedoch weder durch Detektion des HA- noch des cMyc-Epitops mit einem spezifischen Antikörper nachweisen. Daher handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine unspezifische Verunreinigung, welche keinen weiteren Einfluß auf die Assemblierung eines funktionalen Hexamers ausübt.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass eine stabile Expression verschiedener funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe mit den hier vorgestellten Systemen zur bicistronischen und dualen Expression möglich sind. Ohne eine weitere Optimierung der Expression konnte ausreichend Protein zur weiteren Analyse hergestellt werden. Um die Ausbeute an funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexen einer späteren biotechnologischen oder



pharmazeutischen Verwendung anzupassen, sollte eine Optimierung der Expressionsbedingungen, die Analyse verschiedener Expressionsstämme und ein *upscaling* der Zellvolumina, z.B. durch Verwendung von Fermentatoren angestrebt werden.

### 5.1.2. Untersuchungen zur biologischen Aktivität funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe

#### Generierung monospezifischer Tim10/Tim9-Komplexe

Im Abschnitt 4.2 wurde die Funktionalisierung von Tim10/Tim9-Komplexen mit biologisch relevanten Bindemolekülen untersucht. Dafür wurden zunächst monospezifische VEGFR2-bindende Varianten generiert. Die Funktionalisierung erfolgte mit pseudozyklischen Peptiden, welche aus einer Phagenbibliothek selektiert wurden [115]. Die verwendeten Peptide P-3 und P-4 binden den Rezeptor mit unterschiedlicher Affinität. Ahn und Kollegen konnten dabei durch Homo- und Heterooligomerisierung die Affinität zu den Rezeptor verstärken. Vor allem durch Heterooligomerisierung konnte eine Dissoziationskonstante im pikomolaren Bereich erzielt werden (Tab. 4.2.2). Zunächst wurde die Ausbeute an rekombinant hergestellten funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplex analysiert. Im Vergleich zu den in Abschnitt 4.1.3 hergestellten Kontrollkonstrukten, welche mit einfachen, nicht zyklisierten Peptiden funktionalisiert wurden, sank die durchschnittliche Ausbeute aus 1 L Zellkultur einer OD<sub>600</sub> von 0,5 um den Faktor 3-60 (Tab. 4.2.1). Die geringere Ausbeute ist wahrscheinlich in erster Linie auf die zusätzliche Disulfidbrücke je funktionalisierten Peptid zurückzuführen. Bei der Expression können die zusätzlichen Cysteinreste der pseudozyklischen Peptide zur Verknüpfung unspezifischer intermolekularer Disulfidbrücken und somit zur Aggregation und Präzipitation der Tim10/Tim9-Komplexe führen. Dies konnte auch durch die durchschnittlich 17-28 % niedrigere Ausbeute bei der Variante Tim10C-P-3/Tim9C-P-4 bestätigt werden, welche insgesamt zwölf zusätzliche Cysteinreste aufweist. Diese Variante wurde sowohl C-terminal an der Tim10- als auch an der Tim9-Untereinheit funktionalisiert. Die korrekte Oligomerisierung, des mit VEGFR-2-Bindern funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexes, konnte durch BN-PAGE nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde die Rezeptorspezifische Affinität der neu generierten Bindemoleküle untersucht. Dies erfolgte mit einem fortéBIO® Octed Red *Biolayer* Interferometrie System an dem Rezeptor VEGFR-2. Die Bindemoleküle wurden dabei mit einem Kontrollkonstrukt verglichen, welches dem Analyten mit ausgetauschter, nicht spezifischer Passagierbindedomäne entsprach. Die Bestimmung der Affinität und Avidität erfolgte durch die Auswertung der Assoziations- und Dissoziationskurve mit dem fortéBIO® *Analysis* Programm. Für das *Fitting* der gemessenen Assoziations- und Dissoziationskurven wurde ein einfaches Langmuir 1:1 Modell verwendet. Zudem wurde ein lokales *Fitting* jeder einzelnen Kurve durchgeführt und die jeweiligen Dissoziationskonstanten gemittelt.

Die Auswertungen der Güte des *Fittings*, durch die Analyse der Summe der quadratischen Abweichungen ( $X^2$ -Analyse) und der Ermittlung des Bestimmtheitsmaßes (Tabelle 4.2.2) zeigen, dass die Bindung des funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexes wie erwartet nicht einem 1:1 Modell folgt. Die Abweichung des *Fittings* zur Messung beträgt bis zu 15%. Eine Abweichung bis zu 5% wird als obere Grenze zur validen Beschreibung eines Modells angesehen (persönliche Kommunikation Philip Buckle, fortéBIO). Die exakte Auswertung der Bindung von funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexen an ein Zielprotein ist also mit verschiedenen Problemen behaftet. Das Analyseprogramm bietet zur Bestimmung der Dissoziationskonstante nur 1:1 und 1:2 Modelle für die Anpassung der Langmuir-Gleichung an. Da das stöchiometrische Verhältnis bei der Bindung eines funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexes an einen Rezeptor 1:3 beträgt, kann mit diesen Modellen eine genaue Bestimmung einer Dissoziationskonstante nicht erfolgen. Ein Vergleich eines 1:1 Modells mit einem trivalenten Modell hat gezeigt, dass bei Verwendung eines trivalenten Modells im Vergleich zu einem 1:1 Interaktionsmodells Abweichungen der  $K_d$  auftreten. Bei Anwendung des trivalenten Modells zur Berechnung der Bindungskonstante eines trimeren synthetischen CD40L mimetischen Peptids wurde von Wieckowski und Kollegen eine um den Faktor 3-4 höhere  $K_d$  ermittelt [120]. Daher liefern die bei Anwendung eines 1:1 Interaktionsmodells ermittelten Daten keine exakten Bindungskonstanten, sondern geben die Größenordnung der Affinität an. Zudem

konnte bei der Immobilisierung von Antikörpern eine Abweichung eines 1:1 Modells bei einer zu hohen Beladung des Sensors gezeigt werden [121]. Dieser Effekt tritt bei der Analyse von Molekülen mit mehreren Valenzen auf. Diese neigen zu der Bindung benachbarter Moleküle und somit zu einer komplexeren Bindedynamik. Um dies zu kompensieren, wurde sowohl eine geringe Beladung der Sensoren mit dem Zielmolekül als auch eine niedrige Konzentration an löslichen Bindemolekülen gewählt. Damit konnte teilweise eine Bindung des funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexes an benachbarte Rezeptoren auf dem Sensor entgegengewirkt werden und das *Fitting* an die real gemessene Kurve angenähert werden.

Die drei in diesem Abschnitt generierten Varianten zeigten eine spezifische Bindung an den Rezeptor VEGFR-2 (Abb. 4.2.4). Dabei konnte bei den Varianten Tim10C-P-3/Tim9C und Tim10C/Tim9C-P-4 durch Verdopplung der eingesetzten Konzentration an löslichen Analyten eine Vervierfachung des relativen Schichtdickenzuwachs beobachtet werden. Auf Grund der komplizierten Bindungsverhältnisse des heterooligomeren Tim10C-P-3/Tim9C-P-4-Konstruktes (di-Trimer) wurde von einer Berechnung der apparenten Dissoziationskonstante abgesehen. In Anbetracht der oben genannten Einschränkungen werden für die generierten funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe somit Dissoziationskonstanten im zweistellig nanomolaren Bereich erwartet. Dies entspricht in etwa den Literaturwerten der homodimeren P-3- (7 nM) und P-4-Peptide (299 nM), wie sie bei Shrivastava und Kollegen beschrieben sind [102].

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Generierung monospezifischer Homo- und Heterooligomere über den Tim10/Tim9-Komplex möglich ist. Es konnte eine spezifische, konzentrationsabhängige Bindung an den VEGFR-2 gezeigt werden. Die ermittelten angenäherten Werte für die erwarteten Dissoziationskonstanten lagen im Bereich zuvor gemessener Homooligomere.

### Generierung bispezifischer Tim10/Tim9-Komplexe

Weiterhin wurde im Abschnitt 4.2.2 die Generierung eines bispezifischen funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexes zur Bindung an den ErbB2 und an den VEGFR-2 Rezeptor untersucht. Um einer gegenseitigen Behinderung der Binder

entgegenzuwirken, wurde das bispezifische Konstrukt so konzipiert, dass das pseudozyklische Peptid AHNP, N-terminal an die Tim10-Untereinheit und das pseudozyklische Peptide P-4 C-terminal an die Tim9-Untereinheit fusioniert wird. Als Kontrollkonstrukte wurden monospezifische analog fusionierte Varianten hergestellt, welche anstatt des alternierenden Bindungspartners einen HA- bzw. cMyc-tag besitzen. Die Ausbeute aus 1 L Zellkultur einer OD<sub>600</sub> von 0,5 an funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplex lag im Bereich der zuvor hergestellten monospezifischen, VEGFR-2-bindenden Varianten. Auffällig ist die erhöhte Ausbeute an dem monospezifischen ErbB2-Bindemolekül. Mit ca. 1,8 mg lag diese im Durchschnitt um den Faktor 6 höher als die generierte monospezifische, VEGFR-2-bindende Variante und mehr als 10-fach höher als die in Abschnitt 4.2.1 generierten monospezifischen VEGFR-2-Bindemoleküle (Tabelle 4.2.1 und 4.2.3). Das auch die bispezifische Variante eine durchschnittlich um den Faktor 3 höhere Ausbeute erzielte, ist daher mit der Verwendung des Peptids AHNP zu begründen. Dieses ist sowohl als 12mer 5 Aminosäuren kürzer, als auch N-terminal an die Tim10-Untereinheit fusioniert, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit bei der Expression und bei der Assemblierung des Tim10/Tim9-Komplexes weniger interferiert, als eine C-terminale Fusion. Zudem besteht bei einer parallelen C-terminalen Fusion pseudozyklischer Peptide die Möglichkeit unspezifische Disulfidbrücken zwischen den benachbarten Peptiden zu bilden, welches zu einer Aggregation bei der Expression und somit zur Bildung von *inclusion bodies* führen könnte. Die korrekte Assemblierung des Tim10/Tim9-Komplexes wurde mittels BN-PAGE überprüft (Abb. 4.2.7). Diese zeigte singuläre Banden in erwarteter Größe des hexameren funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexes. Insgesamt zeigen die Versuche eine korrekte Assemblierung des funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexes an.

Die Untersuchung der spezifischen Bindung an die Rezeptoren VEGFR-2 und ErbB2 erfolgte mit dem fortéBIO® Octed Red *Biolayer* Interferometrie System. Dafür wurde die Bindung mittels an ProteinA-Sensoren immobilisierten Rezeptoren einzeln gemessen und mit den jeweiligen monospezifischen Varianten verglichen. Für die monospezifischen Varianten wurde das Kontrollkonstrukt Tim10N/Tim9C als Negativkontrolle verwendet, welches den zu untersuchenden Analyten mit ausgetauschter, nicht spezifischer Passagierdomäne entspricht.

Auch bei dieser Messung zeigt sich, dass die untersuchte Bindung nicht einem 1:1 Modell entspricht. Dies ist ein starker Hinweis auf eine Bindung an den Rezeptor, bei der Avidität durch simultane Bindung an mehrere Rezeptormoleküle auftritt. Dieser Effekt war erwünscht und erwartet, da er zu einer erhöhten apparenten Affinität führt und sich z.B. in der Bindungskurve dadurch zeigt, dass eine sehr langsame Dissoziation vom Rezeptor stattfindet. Die Abweichung des verwendeten Modells zur real gemessenen Assoziation und Dissoziation beträgt bis zu 14 % bei erhöhter Konzentration des Analyten, bei niedriger Konzentration bis zu 5%. Generell zeigte jede analysierte Variante eine konzentrationsabhängige Bindung an die jeweiligen Rezeptoren. So konnte bei der Bindung an den Rezeptor VEGFR-2 bei Verdopplung der eingesetzten Konzentration an Analyten ein 1,5-fach höherer relativer Schichtdickenzuwachs beobachtet werden. Bei der Bindung an den ErbB2-Rezeptor konnte bei einer durchschnittlichen Erhöhung der eingesetzten Konzentration um ca. 33% ein um 50% höherer relativer Schichtdickenzuwachs ermittelt werden. Alle ermittelten Affinitäten deuten auf eine Dissoziationskonstante im nanomolaren Bereich hin. Für das AHNP-Monomer wurde eine  $K_D$  von 300 nM beschrieben [110]. Für eine tetramere Variante, die durch Biotinylierung an Streptavidin generiert wurde, lag die  $K_d$  bei 8 nM [111]. Die hier ermittelte zwischen den Werten eines Monomers und Tetramers liegende zweistellig nanomolare apparente Dissoziationskonstante eines Trimers entspricht damit den Erwartungen. Bei der Trimerisierung des P-4 Peptids durch die Konstrukte Tim10N/Tim9C-P-4 und Tim10N-AHNP/Tim9C-P-4 konnten apparente Dissoziationskonstanten im einstellig nanomolaren Bereich errechnet werden. Dies zeigt einen Aviditätseffekt bei der Oligomerisierung des P-4-Peptids an.

Da bei allen Messungen dieselben Einstellungen für das *Fitting* verwendet wurden, ist an dieser Stelle ein direkter Vergleich mit in diesem Abschnitt generierten monospezifischen Varianten Tim10N-AHNP/Tim9C und Tim10N/Tim9C-P-4 möglich. Die ermittelten apparenten Dissoziationskonstanten der bispezifischen Variante Tim10N-AHNP/Tim9C-P-4 lag mit ca. 30 nM gegenüber dem ErbB2-Rezeptor und mit ca. 8,5 nM gegenüber dem VEGFR-2 im selben Bereich wie die monospezifischen Varianten (ErbB2-Bindung: 40 nM, VEGFR-2-Bindung 6 nM). Da bei der Bindung der Konstrukte an den VEGFR-2 bei der höchsten eingesetzten

Konzentration an Analyt eine starke Abweichung des Modells von der gemessenen Assoziations- und Dissoziationskurve vorlag, wurde eine weitere Auswertung der Bindungsaffinität mit den beiden niedrigeren Konzentrationen durchgeführt. Dabei ergab die  $X^2$ -Analyse wie erwartet durchschnittlich mit 0,02 gegenüber 0,09 für das monospezifische Konstrukt bzw. 0,06 gegenüber 0,15 für das bispezifische Konstrukt etwas bessere Werte. Jedoch veränderte sich die durchschnittliche apparente Dissoziationskonstante mit 9,5 nM gegenüber 8,5 nM bzw. 5,5 nM gegenüber 6 nM nur geringfügig.

Ein Vergleich der monospezifischen Variante Tim10N/Tim9C-P-4 und der bispezifischen Variante Tim10N-AHNP/Tim9C-P-4 mit der im Abschnitt 4.2.1. beschriebenen monospezifischen Variante Tim10C/Tim9C-P-4 zeigte eine Verbesserung der Affinität gegenüber dem Rezeptor VEGFR-2. Die ermittelten Dissoziationskonstanten lagen bei den Varianten Tim10N/Tim9C-P-4 und Tim10N-AHNP/Tim9C-P-4 bei durchschnittlich 7,5 nM und bei der in Abschnitt 4.2.1. analysierten Variante Tim10C/Tim9C-P-4 bei 70 nM. Da der einzige Unterschied zwischen den generierten Varianten die N- bzw. C-terminale Fusion der zweiten Passagierdomäne an der Tim10-Untereinheit ist, deuten die Versuche darauf hin, dass möglicherweise eine sterische Hinderung zwischen parallel an demselben Terminus der jeweilig anderen Untereinheit fusionierten Peptiden vorliegt.

Somit konnte gezeigt werden, dass durch die Fusion unterschiedlicher Bindemoleküle an die einzelnen Untereinheiten eine bispezifische Variante erzeugt werden konnte, die im Vergleich zu den monospezifischen Varianten ähnliche Dissoziationskonstanten aufzeigt. Zudem geben diese Befunde Hinweise auf Möglichkeiten und Grenzen der Anwendungen des Tim10/Tim9-Gerüsts. Es empfiehlt sich, dass die Fusion von weiteren Binde- oder Detektionspeptiden alternierend an N- oder C-Terminus der Untereinheiten zu unternehmen, um einer gegenseitigen räumlichen Beeinträchtigung entgegen zu wirken. Im Bezug auf die im Abschnitt 4.2.1. beschriebenen monomeren Varianten, sollte bei zukünftigen Varianten keine weitere Fusion an den alternierenden C-Termini der Untereinheiten erfolgen, sondern nur alternierend an die N-Termini der jeweilig anderen Untereinheiten.

### Oligomerisierung von Mikroproteinen

Ziel des Abschnitts 4.2.3 war die Oligomerisierung eines in Hinsicht auf die Faltung komplexen Mikroproteins über den mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplex. Dafür wurde das Thrombopoietin-Rezeptor (TPOR, cMpl) bindende Mikroprotein ET-TP-020 gewählt [19]. Aufgrund der in den Abschnitten 4.2.1 und 4.2.2 gesammelten Erkenntnisse und der komplexen Faltung der Mikroproteine wurde von einer parallelen Fusion an beide C-Termini abgesehen. Daher wurde das Konstrukt Tim10N/Tim9C als Basis für die funktionalisierten Varianten und als Kontrollkonstrukt für die Affinitätsmessungen verwendet. Für die Untersuchung der Oligomerisierung des Mikroproteins wurden die beiden Varianten Tim10N-ET-TP-020/Tim9C (für die N-terminale Fusion an Tim10) und Tim10N/Tim9C-ET-TP-020 (für die C-terminale Fusion an Tim9) erzeugt.

Aufgrund der Aktivierung des TPOR durch Dimerisierung erfolgten bisherige Untersuchungen zur Modulation des TPOR nur durch monomere oder dimere Bindeproteine. So konnte z.B. durch Krause und Kollegen bei dem hier verwendeten Mikroprotein ET-TP-020 gezeigt werden, dass es in monomerer Form eine stark antagonistische Wirkung auf rhTPO hat [19]. Eine nahezu vollständige Inhibition der durch TPO vermittelten Signaltransduktion konnte in einem Testassay erzielt werden. Durch Dimerisierung des ET-TP-020 gelang es einen Agonisten zu generieren, welcher mit einer  $EC_{50}$  von 1,6 nM um den Faktor 10 höher ist, als die parallel gemessene  $EC_{50}$  von rhTPO. Da es jedoch keine Erfahrungen über die Modulation des Thrombopoietin-Rezeptors mit trimeren Bindern gibt, sollte in dieser Arbeit durch die alternierende Fusion an den N- und C-Terminus unter anderem die Beeinflussung des Abstandes zwischen den Valenzen auf den TPOR untersucht werden.

Die Ausbeute an Protein normiert auf 1 L Zellkultur einer  $OD_{600}$  von 0,5 liegt trotz der komplexen Faltung des fusionierten Mikroproteins auf dem Niveau der funktionalisierten Varianten mit pseudozyklischen Peptiden (Tab. 4.2.5). Da das Mikroprotein ET-TP-020 bisher nur durch Fusion an Faltungshelfer, wie z.B. Thioredoxin intrazellulär in ausreichender Menge rekombinant synthetisiert werden konnte (persönliche Kommunikation Prof Dr. Harald Kolmar), deuten die Ergebnisse auf eine mögliche Chaperonfunktion des Tim10/Tim9-Komplexes hin,

wie sie in der Literatur beschrieben wird [53, 58, 86]. Die Analyse der korrekten Assemblierung des funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexes zu einem Hexamer wurde durch BN-PAGE bestätigt (Abb. 4.2.11).

Die Analyse der Bindung an den TPOR erfolgte zunächst an einem fortéBIO® Octed Red *Biolayer* Interferometrie System. Auch hier zeigte sich die erwartete Abweichung der Annäherungsgerade des Modells von den real gemessenen Kurven. Die ermittelten Dissoziationskonstanten lagen für die N-terminal fusionierte Variante bei ca. 40 nM und für die C-terminal fusionierte Variante bei ca. 20 nM. Ein Aviditätseffekt gegenüber dem monomeren Mikroprotein konnte nicht gezeigt werden, da eine Vermessung der Dissoziationskonstante in der Literatur bisher noch nicht erfolgt ist und das monomere Mikroproteine nicht vorlag. Für das native monomere Peptid AF12505 wird bei Cwirla und Kollegen eine  $IC_{50}$  von 2 nM angegeben [114]. Dies deutet zunächst auf eine Verschlechterung der Affinität hin.

Weiterhin wurde die Beeinflussung des Rezeptors in einem Zellproliferationsassay untersucht. Für die Analyse der Modulation des TPO-Rezeptors wurde die humane Zelllinie M-07e verwendet. Diese Zelllinie lässt sich auf rhTPO als Mitogen konditionieren. Durch die zusätzliche oder alternative Gabe zu rhTPO kann mit diesem System die funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexe auf agonistische oder antagonistische TPO-Rezeptor-Aktivität hin analysiert werden. Zunächst wurden die generierten ET-TP-020 Varianten auf eine vermeintlich agonistische Aktivität hin untersucht.

Bei beiden Varianten konnte eine agonistische Aktivität gezeigt werden (Abb. 4.2.13). Dabei konnte bei den funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexen ein glockenförmiger Kurvenverlauf beobachtet werden. Dies entsprach den Erwartungen, da die Rezeptordimerisierung bzw. die resultierende Proliferationsaktivität bei einem Überschuss homodimerer Liganden unmittelbar wieder abfällt [85]. Dieser selbstantagonistische Effekt wird mit der Dimerisierung durch jeweils identische Bindedomänen begründet. Das rhTPO besitzt im Gegensatz zwei unterschiedliche Rezeptor-Bindeepitope, dadurch ist der selbstantagonistische Effekt bei Überschuss an rhTPO sehr gering [19, 88]. Im Vergleich zum rekombinanten humanen Thrombopoietin (rhTPO) konnte eine



Maximalaktivität von 37-48 % erreicht werden. Die  $EC_{50}$ -Werte der trimeren Varianten sind im Vergleich zum rhTPO um den Faktor 10 bis 60 höher. Im Vergleich zu dem in [19] beschriebenen dimeren ET-TP-020 liegen die  $EC_{50}$ -Werte der hier analysierten Varianten in einem ähnlichen Bereich. Die geringere Maximalaktivität ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einen größeren selbstantagonistischen Effekt durch die Präsentation von drei TPO-Rezeptor-bindenden Valenzen zurückzuführen. Zwischen der N-terminal und C-terminal fusionierten ET-TP-020-Varianten konnten nur geringe Unterschiede beobachtet werden. Der  $EC_{50}$ -Wert der N-terminal fusionierten Variante war im Vergleich zu der C-terminal fusionierten Variante um den Faktor 6 höher, jedoch konnte eine um 11% höhere maximale Aktivität erreicht werden. Die Dimerisierung des TPO-Rezeptors scheint durch die Veränderung des Abstandes der einzelnen Valenzen zueinander von ca. 30 Å auf ca. 70 Å nicht beeinflusst zu werden.

Somit konnte auch in einem Gerüstprotein, welches ein TPOR-bindendes Mikroprotein in trimerer Valenz präsentiert, eine Aktivierung des TPOR gezeigt werden. Dies konnte auch durch die Untersuchung auf eine antagonistische Aktivität bestätigt werden. Für die Analyse wurden mit rhTPO stimulierte Zellen mit einer Konzentrationsreihe an funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplexen koinkubiert (Abb. 4.2.14). Im Vergleich zu unstimulierten (ohne rhTPO und ohne ET-TP-020) und stimulierten (nur mit rhTPO) Zellen konnte keine spezifische antagonistische Aktivität nachgewiesen werden.

### 5.1.3. Spezifische chemische Konjugation funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe

Im Abschnitt 4.2 wurde gezeigt, dass durch Fusion zweier verschiedener Peptide an die Tim10- und Tim9-Untereinheit Heterooligomere Tim10/Tim9-Komplexe hergestellt werden können. Wünschenswert für Anwendungen, z.B. in der Fluoreszenzmikroskopie, wäre die Synthese von Heterooligomeren, bei dem z.B. die Tim10-Untereinheit mit einem Fluoreszenzfarbstoff ortsselektiv verknüpft ist, während die Tim9-Untereinheit ein rezeptorbindendes Peptid trägt. Um einen synthetischen Zugang zu solchen Konstrukten zu schaffen, wurde in einem Modellexperiment der Versuch unternommen, eine aminoterminal

Fluoreszenzmarkierung der Tim10-Untereinheit zu erhalten und heterooligomere Tim10/Tim9-Komplex zu generieren.

Eine derartige Vorgehensweise erfordert die Anwesenheit eines aminoterminalen Serinrestes. In *E. coli* ist die Excision des aminoterminalen Methionins durch die Methionylaminopeptidase abhängig von den nachfolgenden Aminosäureresten. Dabei ist eine Präferenz vor allem kleiner Reste zu beobachten [122]. In einem Protein mit Serin an Position zwei der Peptidkette ist eine Prozessierung des aminoterminalen Methionins jedoch verringert. Daher wurde in dieser Arbeit von der Tatsache Gebrauch gemacht, dass TEV-Protease bei proteolytischer Prozessierung eines Fusionsproteins aufgrund ihrer Erkennungssequenz ENLYFQ/S den carboxyterminalen Fusionspartner mit einem aminoterminalen Serinrest entlässt. Dementsprechend konnte eine Tim-Komplexvariante generiert werden, die nach TEV-Protease Prozessierung und Abspaltung eines kurzen Sequenzanhängsels ein aminoterminales Serin enthielt, welches selektiv chemisch modifiziert wurde und dann zur Kopplung eines Fluoreszenzfarbstoffes bereitstand.

Die Konjugationsreaktion erfolgte in zwei Schritten: (1) eine selektive Oxidation des aminoterminalen Serins mit Natriumperiodat unter Bildung eines Aldehyds und (2) eine Konjugation mit einem Fluoreszenzfarbstoff, der als funktionale Gruppe ein Thiosemicarbazid oder Hydrazon enthält.

Es konnte durch Gelfiltrationsexperimente gezeigt werden, dass der hexamere Komplex nach Oxidation und Farbstoffkopplung erhalten bleibt. Die markierten Tim10/Tim9-Komplexe konnten durch Gelfiltration isoliert werden. Eine Analyse der isolierten Tim10/Tim9-Komplexe im SDS-Gel bei Illumination im UV-Bereich zeigt an, dass selektiv die aktivierte Tim10-Untereinheit, nicht aber die Tim9-Untereinheit, welches kein Serin am N-Terminus enthielt, markiert wurde.

Damit wurde gezeigt, dass die chemische Modifizierung rekombinant hergestellter funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe unter der Einhaltung der spezifischen hexameren Struktur möglich ist. Für zukünftige Versuche sollte eine Untersuchung der Bindungseigenschaften der modifizierten Varianten angegangen werden. Zudem ermöglicht die chemische Modifikation das Funktionalisieren mit

Bindepeptiden, die z.B. nicht-natürliche Aminosäuren beinhalten oder mit chemisch synthetisierten *small molecules*. Zudem kann eine Konjugation von rekombinanten Proteinen erfolgen, welche nicht als Fusion mit dem Tim10/Tim9-Komplex zu exprimieren sind. Darunter wäre zum Beispiel eine camelide VHH-Domäne, welche zwar nicht als Fusion mit dem Tim10/Tim9-Komplex herzustellen war, jedoch solitär als Thio-redoxinfusion (Daten nicht gezeigt). Durch die Verwendung von multifunktionalen Adaptern, wie zum Beispiel Alkine und Azide in der *Click-Chemie* [35], ermöglicht das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren der Oligomerisierung über den mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplex in Hinblick auf die Möglichkeit der chemischen Modifizierung ein breites Anwendungsspektrum.

### 5.2. Ausblick

Trimeren Grundgerüsten zur Oligomerisierung von rezeptorspezifischen Bindern kommen in der Biotechnologie eine immer größere Bedeutung zu. Neben Aviditätseffekten spielt dabei die Modulation trimerer Rezeptoren und Liganden eine wichtige Rolle [123-126]. Bisher wurden nur wenige für die Verwendung in der Biotechnologie geeigneten Proteinstrukturen in der Literatur beschrieben, die eine Heterooligomerisierung erlauben [127-130]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine rekombinante Herstellung heterooligomerer funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe möglich ist. Es wurde ein rekombinantes Expressionverfahren aufgebaut, welches sich die Autoassemblierung der hier verwendeten Tim10- und Tim9-Untereinheiten zu einem funktionalen Hexamer zunutze macht. Für zukünftige Anwendungen sollte eine Erhöhung der Ausbeute an rekombinanten funktionalisierten Tim10/Tim9-Komplex angestrebt werden. Durch Bindungsanalysen konnte gezeigt werden, dass eine spezifische Bindung funktionalisierter Tim10/Tim9-Komplexe an pharmazeutisch wichtige Rezeptoren möglich ist. Studien zur biomolekularen Interaktion lieferten starke Hinweise auf einen Aviditätseffekt bei der Bindung an Rezeptormoleküle. Neben der Oligomerisierung von hinsichtlich ihrer Faltung komplexen Mikroproteinen, konnte eine Aktivierung eines TPO-Rezeptors *in vivo* gezeigt werden. Für weitere Analysen zur Avidität wäre eine Kreuzvalidierung der im *Biolayer Interferometriesystem* erzeugten Daten durch Anwendung von

Plasmonresonanzspektroskopie (Biacore) oder isothermale Kalorimetrie wünschenswert. Zudem sollte eine Analyse des bispezifischen Tim10/Tim9-Komplexes *in vivo* erfolgen. Abschließend konnte in dieser Arbeit die chemische Konjugation eines Fluoreszenzfarbstoffes spezifisch an die Tim10-Untereinheit unter Beibehaltung einer hexameren Struktur ermöglicht werden. In einem weiteren Schritt sollten nun Peptide oder komplexe Proteine wie z.B. camelide VHH-Domänen, welche nicht rekombinant mit dem Tim10/Tim9-Komplex-System hergestellt werden konnten, chemisch gekoppelt werden.

### 6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war der Aufbau und die Etablierung eines rekombinanten Oligomerisierungsverfahrens von Peptiden und kleinen Proteinen über den mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplex. Das System sollte in Hinsicht auf die Generierung bispezifischer Oligomere, der Oligomerisierung von Proteinen, der Bindung und Modulation pharmazeutisch relevanter Rezeptoren und der chemischen Funktionalisierung untersucht werden.

Im ersten Abschnitt der Arbeit erfolgte der Aufbau eines robusten Expressionssystems zur Bereitstellung funktionalisierter Tim10/9-Komplexe. Es war möglich sowohl ein bicistronisches als auch ein duales Expressionssystem zu etablieren. Beide Systeme stellten funktionalisierte Tim10/Tim9-Komplexe für weitere Analysen in ausreichender Mengen bereit. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Integrität der hexameren Struktur bei N- oder C-terminaler Fusion einer Passagierdomäne an die Tim9- oder Tim10-Untereinheit erhalten blieb.

Der zweite Abschnitt beschäftigte sich mit der Generierung biofunktionaler Tim10/Tim9-Komplexe. Dabei war es möglich sowohl pseudozyklische Peptide, als auch Cystin-Knoten-Mikroproteine über Fusion an den Tim10/Tim9-Komplex zu oligomerisieren. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Oligomerisierung eines VEGFR-2 spezifischen Bindepeptids über den mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplex eine höhere Affinität gegenüber dem Rezeptor erreicht werden konnte. Zudem war es möglich, durch die Kombination ErbB2-bindender und VEGFR-2-bindender Tim10/Tim9-Komplexe eine bispezifische Variante herzustellen. Bei der Inhibition beider Signaltransduktionswege konnte in verschiedenen Arbeiten ein synergistischer Effekt in Bezug auf die Suppression von Tumorwachstum gezeigt werden [107-109]. Als Vertreter der Proteinfamilie konnten hinsichtlich ihrer Faltung komplexe Cystin-Knoten-Mikroproteine oligomerisiert werden. Die verwendete Variante ET-TP-020 stimulierte in oligomerisierter Form die Proliferation von M-07e Zellen. Die Stimulation der Zellproliferation setzt eine Darreichung des Bindeproteins in oligomerer Form voraus. Diese Ergebnisse zeigen an, dass die in dieser Arbeit generierten Komplexe auch im zellulären Kontext eine oligomerisierungsabhängige Aktivität aufweisen.

Im letzten Abschnitt wurde die Möglichkeit der spezifischen chemischen Funktionalisierung untersucht. Dabei konnte ein Verfahren aufgebaut werden, das durch Oxidation des durch Spaltung mit TEV-Protease erhaltenen N-terminalen Serins zu einer Aldehydfunktion eine spezifische Kopplung von Hydrazid- oder Thiosemicarbazidderivaten ermöglicht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Kopplung eines Fluorescein-5-Thiosemicarbazids spezifisch an die Tim10-Untereinheit erfolgt und die Integrität des Tim10/Tim9-Komplexes erhalten bleibt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine rekombinante Oligomerisierung pharmazeutisch relevanter Peptide und Proteine über den mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplex möglich ist und die Oligomerisierung zu einer besseren Affinität konjugierter Peptide führen kann. Das hier vorgestellte System ermöglicht zudem eine gerichtete chemische Funktionalisierung bereits rekombinant funktionalisierter mitochondrialer Tim10/Tim9-Komplexe.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Ehrlich, H. L. **(1990)**: *Geomicrobiology*, 2nd ed., rev. and expanded., Marcel Dekker, New York.
2. Hofmann, H., Grey, K., *et al.* **(1999)**: *Origin of 3.45 Ga Coniform Stromatolites in Warrawoona Group, Western Australia*, **Geological Society of America**, 8, 1256-62.
3. El Albani, A., Bengtson, S., *et al.* **(2010)**: *Large Colonial Organisms with Coordinated Growth in Oxygenated Environments 2.1 Gyr Ago*, **Nature**, 7302, 100-4.
4. Donoghue, P. and Antcliffe, J. **(2010)**: *Early Life: Origins of Multicellularity*, **Nature**, 41-2.
5. Michod, R. **(2007)**: *Evolution of Individuality During the Transition from Unicellular to Multicellular Life*, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Suppl 1, 8613.
6. Zhu, J., Miller, M., *et al.* **(2002)**: *Quorum-Sensing Regulators Control Virulence Gene Expression in Vibrio Cholerae*, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 5, 3129.
7. May, T., Shinabarger, D., *et al.* **(1991)**: *Alginate Synthesis by Pseudomonas Aeruginosa: A Key Pathogenic Factor in Chronic Pulmonary Infections of Cystic Fibrosis Patients*, **Clinical microbiology reviews**, 2, 191.
8. Passador, L., Cook, J., *et al.* **(1993)**: *Expression of Pseudomonas Aeruginosa Virulence Genes Requires Cell-to-Cell Communication*, **Science**, 5111, 1127.
9. Weber, K., Schulz, B., *et al.* **(2010)**: *The Quorum-Sensing Molecule E,E-Farnesol—Its Variable Secretion and Its Impact on the Growth and Metabolism of Candida Species*, **Yeast**, n/a-n/a.
10. Alberts, B. **(1994)**: *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed., Garland Pub., New York.
11. Holbro, T., Civenni, G., *et al.* **(2003)**: *The Erbb Receptors and Their Role in Cancer Progression*, **Exp Cell Res**, 1, 99-110.

12. Hynes, N. E., Horsch, K., *et al.* **(2001)**: *The Erbb Receptor Tyrosine Family as Signal Integrators*, **Endocr Relat Cancer**, 3, 151-9.
13. Neufeld, G., Cohen, T., *et al.* **(1999)**: *Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) and Its Receptors*, **The FASEB Journal**, 1, 9-22.
14. Winder, T. and Lenz, H. J. **(2010)**: *Vascular Endothelial Growth Factor and Epidermal Growth Factor Signaling Pathways as Therapeutic Targets for Colorectal Cancer*, **YGASt**, 6, 2163-76.
15. Singh, J., Garber, E., *et al.* **(1998)**: *The Role of Polar Interactions in the Molecular Recognition of Cd40l with Its Receptor Cd40*, **Protein Science**, 5, 1124-35.
16. van Kooten, C. and Banchereau, J. **(2000)**: *Cd40-Cd40 Ligand*, **J Leukoc Biol**, 1, 2-17.
17. Kuter, D. J. **(2007)**: *New Thrombopoietic Growth Factors*, **Blood**, 11, 4607-16.
18. Mammen, M., Choi, S., *et al.* **(1998)**: *Polyvalente Wechselwirkungen in Biologischen Systemen: Auswirkungen Auf Das Design Und Die Verwendung Multivalenter Liganden Und Inhibitoren*, **Angewandte Chemie**, 20, 2908-53.
19. Krause, S., Schmoldt, H.-U., *et al.* **(2007)**: *Grafting of Thrombopoietin-Mimetic Peptides into Cystine Knot Miniproteins Yields High-Affinity Thrombopoietin Antagonists and Agonists*, **FEBS J**, 1, 86-95.
20. Jeong, K. J., Mabry, R., *et al.* **(2005)**: *Avimers Hold Their Own*, **Nat Biotechnol**, 12, 1493-4.
21. Silverman, J., Liu, Q., *et al.* **(2005)**: *Multivalent Avimer Proteins Evolved by Exon Shuffling of a Family of Human Receptor Domains*, **Nat Biotechnol**, 12, 1556-61.
22. Willuda, J., Kubetzko, S., *et al.* **(2001)**: *Tumor Targeting of Mono-, Di-, and Tetravalent Anti-P185her-2 Miniantibodies Multimerized by Self-Associating Peptides*, **Journal of Biological Chemistry**, 17, 14385-92.
23. Hermanson, G. T. **(1996)**: *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego ; London.



24. Chase, J. W., Merrill, B. M., *et al.* **(1983)**: *F Sex Factor Encodes a Single-Stranded DNA Binding Protein (Ssb) with Extensive Sequence Homology to Escherichia Coli Ssb*, **Proc Natl Acad Sci U S A**, 18, 5480-4.
25. Chu, F. S., Chang, F. C., *et al.* **(1976)**: *Production of Antibody against Ochratoxin A*, **Appl Environ Microbiol**, 6, 831-5.
26. Chu, F. S., Lau, H. P., *et al.* **(1982)**: *Ethylenediamine Modified Bovine Serum Albumin as Protein Carrier in the Production of Antibody against Mycotoxins*, **J Immunol Methods**, 1, 73-8.
27. Chu, F. S. and Ueno, I. **(1977)**: *Production of Antibody against Aflatoxin B1*, **Appl Environ Microbiol**, 5, 1125-8.
28. Yamada, H., Imoto, T., *et al.* **(1981)**: *Selective Modification of Aspartic Acid-101 in Lysozyme by Carbodiimide Reaction*, **Biochemistry**, 17, 4836-42.
29. Avrameas, S. **(1969)**: *Coupling of Enzymes to Proteins with Glutaraldehyde. Use of the Conjugates for the Detection of Antigens and Antibodies*, **Immunochemistry**, 1, 43-52.
30. Avrameas, S. and Ternynck, T. **(1969)**: *The Cross-Linking of Proteins with Glutaraldehyde and Its Use for the Preparation of Immunoabsorbents*, **Immunochemistry**, 1, 53-66.
31. Avrameas, S. and Ternynck, T. **(1971)**: *Peroxidase Labelled Antibody and Fab Conjugates with Enhanced Intracellular Penetration*, **Immunochemistry**, 12, 1175-9.
32. Carlsson, J., Drevin, H., *et al.* **(1978)**: *Protein Thiolation and Reversible Protein-Protein Conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-Pyridyldithio)Propionate, a New Heterobifunctional Reagent*, **Biochem J**, 3, 723-37.
33. Daum, J. R., Tugendreich, S., *et al.* **(2000)**: *The 3f3/2 Anti-Phosphoepitope Antibody Binds the Mitotically Phosphorylated Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome*, **Curr Biol**, 23, R850-2.
34. Ilver, D., Arnqvist, A., *et al.* **(1998)**: *Helicobacter Pylori Adhesin Binding Fucosylated Histo-Blood Group Antigens Revealed by Retagging*, **Science**, 5349, 373-7.

35. Avrutina, O., Empting, M., *et al.* **(2009)**: *Application of Copper (I) Catalyzed Azide-Alkyne [3+ 2] Cycloaddition to the Synthesis of of Template-Assembled Multivalent Peptide Conjugates*, **Organic & Biomolecular Chemistry**, 4177-85.
36. Lee, K.-W., Hur, B.-U., *et al.* **(2009)**: *Methods for Rapid Identification of a Functional Single-Chain Variable Fragment Using Alkaline Phosphatase Fusion*, **BMB Rep**, 11, 731-6.
37. Habicht, G., Haupt, C., *et al.* **(2007)**: *Directed Selection of a Conformational Antibody Domain That Prevents Mature Amyloid Fibril Formation by Stabilizing A $\beta$  Protofibrils*, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 49, 19232.
38. de Kruif, J. and Logtenberg, T. **(1996)**: *Leucine Zipper Dimerized Bivalent and Bispecific Scfv Antibodies from a Semi-Synthetic Antibody Phage Display Library*, **J Biol Chem**, 13, 7630-4.
39. Tripet, B., Yu, L., *et al.* **(1997)**: *Engineering a De Novo Designed Coiled-Coil Heterodimerization Domain for the Rapid Detection, Purification and Characterization of Recombinantly Expressed Peptides and Proteins*, **Protein Eng**, 3, 299.
40. Adams, T. **(2004)**: Funktionelle Charakterisierung potentieller Pathogenitätsfaktoren aus *Pseudomonas Aeruginosa* mittels biochemischer und evolutiver Methoden, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität, Göttingen.
41. Adams, T. and Kolmar, H. **(2010)**: *Means and Methods for Displaying Polypeptides on Cells*, **European Patent Application**, 1-49.
42. Weichel, M., Jaussi, R., *et al.* **(2008)**: *Display of E. Coli Alkaline Phosphatase Piii or Pviii Fusions on Phagemid Surfaces Reveals Monovalent Decoration with Active Molecules*, **Open Biochem J**, 38-43.
43. Steinmann, B., Christmann, A., *et al.* **(2010)**: *In Vivo Enzyme Immobilization by Inclusion Body Display*, **Appl Environ Microbiol**, 16, 5563-9.
44. de Kruif, J., van der Vuurst de Vries, A. R., *et al.* **(1996)**: *New Perspectives on Recombinant Human Antibodies*, **Immunol Today**, 10, 453-5.

45. Kostelny, S. A., Cole, M. S., *et al.* **(1992)**: *Formation of a Bispecific Antibody by the Use of Leucine Zippers*, **J Immunol**, 5, 1547-53.
46. Pfizenmaier, K., Wajant, H., *et al.* **(2008)**: *Trimeric Death Ligands with Enhanced Activity (Tenascin)*, PCT/EP2008/005228.
47. Dervillez, X., Hüther, A., *et al.* **(2006)**: *Stable Expression of Soluble Therapeutic Peptides in Eukaryotic Cells by Multimerisation: Application to the Hiv-1 Fusion Inhibitory Peptide C46*, **ChemMedChem**, 3, 330-9.
48. Ogun, S. A., Dumon-Seignovert, L., *et al.* **(2008)**: *The Oligomerization Domain of C4-Binding Protein (C4bp) Acts as an Adjuvant, and the Fusion Protein Comprised of the 19-Kilodalton Merozoite Surface Protein 1 Fused with the Murine C4bp Domain Protects Mice against Malaria*, **Infection and Immunity**, 8, 3817-23.
49. Libyh, M., Goossens, D., *et al.* **(1997)**: *A Recombinant Human Scfv Anti-Rh (D) Antibody with Multiple Valences Using a C-Terminal Fragment of C4-Binding Protein*, **Blood**, 10, 3978.
50. Berg, D., Lehne, M., *et al.* **(2007)**: *Enforced Covalent Trimerization Increases the Activity of the Tnf Ligand Family Members Trail and Cd95l*, **Cell Death & Differentiation**, 12, 2021-34.
51. Koehler, C. M. **(2004)**: *New Developments in Mitochondrial Assembly*, **Annu Rev Cell Dev Biol**, 309-35.
52. Rehling, P., Brandner, K., *et al.* **(2004)**: *Mitochondrial Import and the Twin-Pore Translocase*, **Nat Rev Mol Cell Biol**, 7, 519-30.
53. Wiedemann, N., Pfanner, N., *et al.* **(2006)**: *Chaperoning through the Mitochondrial Intermembrane Space*, **Mol Cell**, 2, 145-8.
54. Curran, S. P., Leuenberger, D., *et al.* **(2002)**: *The Tim9p-Tim10p Complex Binds to the Transmembrane Domains of the Adp/Atp Carrier*, **EMBO J**, 5, 942-53.
55. Lu, H., Allen, S., *et al.* **(2004)**: *Functional Tim10 Chaperone Assembly Is Redox-Regulated in Vivo*, **J Biol Chem**, 18, 18952-8.

56. Mesecke, N., Terziyska, N., *et al.* **(2005)**: *A Disulfide Relay System in the Intermembrane Space of Mitochondria That Mediates Protein Import*, **Cell**, 7, 1059-69.
57. Webb, C., Gorman, M., *et al.* **(2006)**: *Crystal Structure of the Mitochondrial Chaperone Tim9• 10 Reveals a Six-Bladed A-Propeller*, **Molecular cell**, 1, 123-33.
58. Vial, S. **(2002)**: *Assembly of Tim9 and Tim10 into a Functional Chaperone*, **Journal of Biological Chemistry**, 39, 36100-8.
59. Ivanova, E., Jowitt, T., *et al.* **(2008)**: *Assembly of the Mitochondrial Tim9–Tim10 Complex: A Multi-Step Reaction with Novel Intermediates*, **Journal of Molecular Biology**, 1, 229-39.
60. Casadaban, M. J. and Cohen, S. N. **(1980)**: *Analysis of Gene Control Signals by DNA Fusion and Cloning in Escherichia Coli*, **J Mol Biol**, 2, 179-207.
61. Studier, F. W. and Moffatt, B. A. **(1986)**: *Use of Bacteriophage T7 Rna Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes*, **J Mol Biol**, 1, 113-30.
62. Avanzi, G. C., Lista, P., *et al.* **(1988)**: *Selective Growth Response to Il-3 of a Human Leukaemic Cell Line with Megakaryoblastic Features*, **Br J Haematol**, 3, 359-66.
63. Dower, W. J., Miller, J. F., *et al.* **(1988)**: *High Efficiency Transformation of E. Coli by High Voltage Electroporation*, **Nucleic Acids Res**, 13, 6127-45.
64. Downey, N. **(2003)**: *Extraction of DNA from Agarose Gels*, **Methods Mol Biol**, 137-9.
65. Mullis, K. B. and Faloona, F. A. **(1987)**: *Specific Synthesis of DNA in Vitro Via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction*, **Methods Enzymol**, 335-50.
66. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., *et al.* **(1988)**: *Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase*, **Science**, 4839, 487-91.

67. Saiki, R. K., Scharf, S., *et al.* **(1985)**: *Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia*, **Science**, 4732, 1350-4.
68. Taylor, M. S., Challed-Spong, A., *et al.* **(1997)**: *Co-Amplification of the Amelogenin and Hla Dq Alpha Genes: Optimization and Validation*, **J Forensic Sci**, 1, 130-6.
69. French, C. S. and Milner, H. W. **(1955)**: *[9] Disintegration of Bacteria and Small Particles by High-Pressure Extrusion*, 64-7.
70. Nunn, C. M., Jeeves, M., *et al.* **(2005)**: *Crystal Structure of Tobacco Etch Virus Protease Shows the Protein C Terminus Bound within the Active Site*, **J Mol Biol**, 1, 145-55.
71. Parks, T. D., Leuther, K. K., *et al.* **(1994)**: *Release of Proteins and Peptides from Fusion Proteins Using a Recombinant Plant Virus Proteinase*, **Anal Biochem**, 2, 413-7.
72. Phan, J., Zdanov, A., *et al.* **(2002)**: *Structural Basis for the Substrate Specificity of Tobacco Etch Virus Protease*, **J Biol Chem**, 52, 50564-72.
73. Laemmli, U. K. **(1970)**: *Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*, **Nature**, 5259, 680-5.
74. Schagger, H. **(2006)**: *Tricine-Sds-Page*, **Nat Protoc**, 1, 16-22.
75. Schagger, H. and von Jagow, G. **(1987)**: *Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 Kda*, **Anal Biochem**, 166, 368-79.
76. Meyer, T. S. and Lamberts, B. L. **(1965)**: *Use of Coomassie Brilliant Blue R250 for the Electrophoresis of Microgram Quantities of Parotid Saliva Proteins on Acrylamide-Gel Strips*, **Biochim Biophys Acta**, 1, 144-5.
77. Thompson, D. and Larson, G. **(1992)**: *Western Blots Using Stained Protein Gels*, **Biotechniques**, 5, 656-8.
78. Reisinger, V. and Eichacker, L. A. **(2006)**: *Analysis of Membrane Protein Complexes by Blue Native Page*, **Proteomics**, 6-15.

79. Schgger, H. and von Jagow, G. **(1991)**: *Blue Native Electrophoresis for Isolation of Membrane Protein Complexes in Enzymatically Active Form*, **Anal Biochem**, 2, 223-31.
80. Blake, M. S., Johnston, K. H., et al. **(1984)**: *A Rapid, Sensitive Method for Detection of Alkaline Phosphatase-Conjugated Anti-Antibody on Western Blots*, **Anal Biochem**, 1, 175-9.
81. Renart, J., Reiser, J., et al. **(1979)**: *Transfer of Proteins from Gels to Diazobenzyloxymethyl-Paper and Detection with Antisera: A Method for Studying Antibody Specificity and Antigen Structure*, **Proc Natl Acad Sci U S A**, 7, 3116-20.
82. Swanson, J., Mayer, L. W., et al. **(1982)**: *Antigenicity of Neisseria Gonorrhoeae Outer Membrane Protein(S) Iii Detected by Immunoprecipitation and Western Blot Transfer with a Monoclonal Antibody*, **Infect Immun**, 2, 668-72.
83. Towbin, H., Staehelin, T., et al. **(1979)**: *Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications*, **Proc Natl Acad Sci U S A**, 9, 4350-4.
84. Hermersdrfer, H. **(1987)**: *T. Lindl Und J. Bauer: Zell- Und Gewebekultur. Einführung in Die Grundlagen Sowie Ausgewhlte Methoden Und Anwendungen.*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New Xork.
85. Perelson, A. S. and DeLisi, C. **(1980)**: *Receptor Clustering on a Cell Surface. I. Theory of Receptor Cross-Linking by Ligands Bearing Two Chemically Identical Functional Groups*, **Mathematical Biosciences**, 1-2, 71-110.
86. Lu, H. **(2004)**: *The Structural Basis of the Tim10 Chaperone Assembly*, **Journal of Biological Chemistry**, 18, 18959-66.
87. Schmoldt, H. **(2005)**: *Neue Enzyminhibitoren und Rezeptoragonisten durch Variation funktionaler Schleifen von Mikroproteinen*, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität, Göttingen.
88. Krause, S. **(2005)**: *Ein Adaptierbares zelluläres Testsystem zur Erfassung der Aktivität von Zytokinrezeptorliganden \*\*\* Entwicklung und Anwendung zur Identifizierung und Charakterisierung pharmazeutisch relevanter Rezeptor-(Ant)agonisten*, Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, Carl von Ossietzky Universität, Oldenburg.

89. Luciano, P., Vial, S., *et al.* **(2001)**: *Functional Reconstitution of the Import of the Yeast Adp/Atp Carrier Mediated by the Tim10 Complex*, **EMBO J**, 15, 4099-106.
90. Skerra, A. **(1994)**: *A General Vector, Pask84, for Cloning, Bacterial Production, and Single-Step Purification of Antibody Fab Fragments.*, **Gene**, 79-84.
91. Carmeliet, P. **(2000)**: *Mechanisms of Angiogenesis and Arteriogenesis*, **Nat Med**, 4, 389-95.
92. Colville-Nash, P. R. and Willoughby, D. A. **(1997)**: *Growth Factors in Angiogenesis: Current Interest and Therapeutic Potential*, **Mol Med Today**, 1, 14-23.
93. Hanahan, D. and Folkman, J. **(1996)**: *Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch During Tumorigenesis*, **Cell**, 3, 353-64.
94. Folkman, J. **(1990)**: *What Is the Evidence That Tumors Are Angiogenesis Dependent?*, **J Natl Cancer Inst**, 1, 4-6.
95. Gitay-Goren, H., Halaban, R., *et al.* **(1993)**: *Human Melanoma Cells but Not Normal Melanocytes Express Vascular Endothelial Growth Factor Receptors*, **Biochem Biophys Res Commun**, 3, 702-8.
96. Mueller, M. D., Vigne, J. L., *et al.* **(2000)**: *Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) Gene Transcription by Estrogen Receptors Alpha and Beta*, **Proc Natl Acad Sci U S A**, 20, 10972-7.
97. Voelkel, N. F., Vandivier, R. W., *et al.* **(2006)**: *Vascular Endothelial Growth Factor in the Lung*, **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 2, L209-21.
98. Keyt, B. A., Nguyen, H. V., *et al.* **(1996)**: *Identification of Vascular Endothelial Growth Factor Determinants for Binding Kdr and Flt-1 Receptors. Generation of Receptor-Selective Vegf Variants by Site-Directed Mutagenesis*, **J Biol Chem**, 10, 5638-46.
99. Feng, D., Nagy, J. A., *et al.* **(2000)**: *Ultrastructural Localization of the Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor (Vpf/Vegf) Receptor-2 (Flk-1, Kdr) in Normal Mouse Kidney and in the Hyperpermeable*

- Vessels Induced by Vpf/Vegf-Expressing Tumors and Adenoviral Vectors*, **J Histochem Cytochem**, 4, 545-56.
100. Quinn, T. P., Peters, K. G., *et al.* **(1993)**: *Fetal Liver Kinase 1 Is a Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor and Is Selectively Expressed in Vascular Endothelium*, **Proc Natl Acad Sci U S A**, 16, 7533-7.
101. Terman, B. I., Carrion, M. E., *et al.* **(1991)**: *Identification of a New Endothelial Cell Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase*, **Oncogene**, 9, 1677-83.
102. Shrivastava, A., Von Wronski, M. A., *et al.* **(2005)**: *A Distinct Strategy to Generate High-Affinity Peptide Binders to Receptor Tyrosine Kinases*, **Protein Engineering Design and Selection**, 9, 417-24.
103. Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. **(2001)**: *Untangling the Erbb Signalling Network*, **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2, 127-37.
104. Cohen, J. A., Weiner, D. B., *et al.* **(1989)**: *Expression Pattern of the Neu (Ngl) Gene-Encoded Growth Factor Receptor Protein (P185neu) in Normal and Transformed Epithelial Tissues of the Digestive Tract*, **Oncogene**, 1, 81-8.
105. Slamon, D. J., Clark, G. M., *et al.* **(1987)**: *Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the Her-2/Neu Oncogene*, **Science**, 4785, 177-82.
106. Baselga, J., Norton, L., *et al.* **(1998)**: *Recombinant Humanized Anti-Her2 Antibody (Herceptin) Enhances the Antitumor Activity of Paclitaxel and Doxorubicin against Her2/Neu Overexpressing Human Breast Cancer Xenografts*, **Cancer Res**, 13, 2825-31.
107. Traxler, P., Allegrini, P. R., *et al.* **(2004)**: *Aee788: A Dual Family Epidermal Growth Factor Receptor/ErbB2 and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor with Antitumor and Antiangiogenic Activity*, **Cancer Res**, 14, 4931-41.
108. Le, X.-F., Mao, W., *et al.* **(2008)**: *Specific Blockade of Vegf and Her2 Pathways Results in Greater Growth Inhibition of Breast Cancer Xenografts That Overexpress Her2*, **Cell Cycle**, 23, 3747-58.
109. Shaheen, R. M., Ahmad, S. A., *et al.* **(2001)**: *Inhibited Growth of Colon Cancer Carcinomatosis by Antibodies to Vascular Endothelial and Epidermal Growth Factor Receptors*, **Br J Cancer**, 4, 584-9.



110. Park, B. W., Zhang, H. T., *et al.* **(2000)**: *Rationally Designed Anti-Her2/Neu Peptide Mimetic Disables P185her2/Neu Tyrosine Kinases in Vitro and in Vivo*, **Nat Biotechnol**, 2, 194-8.
111. Masuda, K., Richter, M., *et al.* **(2006)**: *Ahnp-Streptavidin: A Tetrameric Bacterially Produced Antibody Surrogate Fusion Protein against P185her2/Neu*, **Oncogene**, 59, 7740-6.
112. Craik, D. J. **(2001)**: *Plant Cyclotides: Circular, Knotted Peptide Toxins*, **Toxicon**, 12, 1809-13.
113. Colgrave, M. and Craik, D. **(2004)**: *Thermal, Chemical, and Enzymatic Stability of the Cyclotide Kalata B1: The Importance of the Cyclic Cystine Knot*, **Biochemistry**, 20, 5965-75.
114. Cwirlla, S. E. **(1997)**: *Peptide Agonist of the Thrombopoietin Receptor as Potent as the Natural Cytokine*, **Science**, 5319, 1696-9.
115. Ahn, B., Rhee, S. G., *et al.* **(1987)**: *Use of Fluorescein Hydrazide and Fluorescein Thiosemicarbazide Reagents for the Fluorometric Determination of Protein Carbonyl Groups and for the Detection of Oxidized Protein on Polyacrylamide Gels*, **Anal Biochem**, 2, 245-57.
116. Kolmar, H., Ferrando, E., *et al.* **(1992)**: *General Mutagenesis/Gene Expression Procedure for the Construction of Variant Immunoglobulin Domains in Escherichia Coli. Production of the Bence-Jones Protein Reiv Via Fusion to Beta-Lactamase*, **J Mol Biol**, 2, 359-65.
117. Cui, T., Gao, Y., *et al.* **(2007)**: *Efficient Preparation of an Acyclic Permutant of Kalata B1 from a Recombinant Fusion Protein with Thioredoxin*, **Journal of biotechnology**, 4, 378-84.
118. di Guan, C., Li, P., *et al.* **(1988)**: *Vectors That Facilitate the Expression and Purification of Foreign Peptides in Escherichia Coli by Fusion to Maltose-Binding Protein*, **Gene**, 1, 21-30.
119. LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., *et al.* **(1993)**: *A Thioredoxin Gene Fusion Expression System That Circumvents Inclusion Body Formation in the E. Coli Cytoplasm*, **Nat Biotech**, 2, 187-93.

120. Wieckowski, S., Trouche, N., *et al.* **(2007)**: *Cooperativity in the Interaction of Synthetic Cd40l Mimetics with Cd40 and Its Implication in Cell Signaling*, **Biochemistry**, 11, 3482-93.
121. Karlsson, R. and Larsson, A. **(2004)**: *Affinity Measurement Using Surface Plasmon Resonance*, **Methods Mol Biol**, 389-415.
122. Hirel, P. H., Schmitter, M. J., *et al.* **(1989)**: *Extent of N-Terminal Methionine Excision from Escherichia Coli Proteins Is Governed by the Side-Chain Length of the Penultimate Amino Acid*, **Proc Natl Acad Sci U S A**, 21, 8247-51.
123. Fournel, S., Wieckowski, S., *et al.* **(2005)**: *C3-Symmetric Peptide Scaffolds Are Functional Mimetics of Trimeric Cd40l*, **Nat Chem Biol**, 7, 377-82.
124. Wieckowski, S., Trouche, N., *et al.* **(2007)**: *Cooperativity in the Interaction of Synthetic Cd40l Mimetics with Cd40 and Its Implication in Cell Signaling†*, **Biochemistry**, 11, 3482-93.
125. Cuesta, A. M., Sanchez-Martin, D., *et al.* **(2009)**: *In Vivo Tumor Targeting and Imaging with Engineered Trivalent Antibody Fragments Containing Collagen-Derived Sequences.*, **PLoS One**, 4, e5381.
126. Fan, C. Y., Huang, C. C., *et al.* **(2008)**: *Production of Multivalent Protein Binders Using a Self-Trimerizing Collagen-Like Peptide Scaffold*, **FASEB J**, 11, 3795-804.
127. Davey, M. J., Indiani, C., *et al.* **(2003)**: *Reconstitution of the Mcm2-7p Heterohexamer, Subunit Arrangement, and Atp Site Architecture*, **J Biol Chem**, 7, 4491-9.
128. Davis, A., Alder, N., *et al.* **(2007)**: *The Tim9p/10p and Tim8p/13p Complexes Bind to Specific Sites on Tim23p During Mitochondrial Protein Import*, **Molecular biology of the cell**, 2, 475.
129. Kamada, K., Hanaoka, F., *et al.* **(2003)**: *Crystal Structure of the Maze/Mazf Complex: Molecular Bases of Antidote-Toxin Recognition*, **Mol Cell**, 4, 875-84.
130. Kovacs, H., O'Donoghue, S. I., *et al.* **(2002)**: *Solution Structure of the Coiled-Coil Trimerization Domain from Lung Surfactant Protein D*, **J Biomol NMR**, 2, 89-102.

131. Biochemistry, I. U. o. **(1978)**: *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, Spottiswoode Ballantyne Press, [s.l.].

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungsverzeichnis

Die verwendeten ein- und dreibuchstabigen Abkürzungen für Aminosäuren, sowie alle verwendeten physikalischen Größen entsprechen der Konvention der *International Union for Biochemistry* [131].

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Å	Ångström (1 Å=10 <sup>-10</sup> m)
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bidest.	zweifach destilliert
<i>bla</i>	β-Laktamase-Gen
BN	<i>Blue native</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-Terminus	Carboxyterminus
ca.	circa
Da	Dalton
deion.	deionisiertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dYT	<i>double Yeast Tryptone</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
g	Gramm
G	Guanin
GFC	Gelfiltrationschromatographie
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung

## 8. Anhang

---

GST	Glutathion-S-Transferasen
h	Stunde
HPLC	<i>pressure/performance liquid chromatography</i> <i>high</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
k	Kilo ( $10^3$ )
kb	Kilobasen
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante des X/Y Komplex
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
Km	Kanamycin
L	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
m	Milli ( $10^{-3}$ )
M	Molar (Mol/Liter)
mA	Milliampere
min	Minute
mm	Millimeter
mol	Mol
M <sub>r</sub>	relatives Molekulargewicht
MWCO	<i>Molecular Weight Cut-Off</i>
n	Nano ( $10^{-9}$ )
N-Terminus	Aminoterminus
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ori	Replikationsursprung
p	Pico ( $10^{-12}$ )
<i>p.A.</i>	<i>pro analysis</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (-Puffer)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
rhTPO	rekombinantes humanes Thrombopoietin
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur ( $\sim 20^\circ\text{C}$ )
s	Sekunde
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SV	Säulenvolumen
T	Thymin
t	Zeit

## 8. Anhang

---

Tab.	Tabelle
TAE	<i>Tris-Acetat-EDTA</i> -(Puffer)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Einheit, <i>unit</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
$\lambda$	Wellenlänge
$\mu$	Mikro (10 <sup>-6</sup> )

### 8.2. Veröffentlichungen

#### Posterpräsentation

Daneschdar, M. *et. al.* **(September 2009)**, *Peptide and Protein Avimers: Bioactive Oligomers by Combined Recombinant and Chemical Synthesis*, 3rd European Conference on Chemistry for Life Science, Frankfurt.

### 8.3. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Leuten bedanken, die an dieser Arbeit maßgeblich beteiligt waren.

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Harald Kolmar für die Bereitstellung des interessanten Themas, der Möglichkeit in seiner Abteilung diese Arbeit anfertigen zu können und der allumfassenden Betreuung bedanken. Dank gilt auch Prof. Markus Engstler für die Übernahme des Korreferats.

Den Gruppenleitern Olga und Andreas danke ich für jeglichen Rat in chemischen und molekularbiologischen Fragen und der konstruktiven Kritik. Der gesamten AG Kolmar (und natürlich den assoziierten Merck'schen Faktoren) danke ich für das angenehme Arbeitsklima und den netten Abenden abseits der Forschung. Insbesondere danke ich Barbara, Janine, Maren, Steffi, Achim, Thombert, Normen und Tim für jegliche Hilfe, einem stets offenen Ohr, den langen durchforschten Nächten und dem Spaß bei der Arbeit.

Besonders danken möchte ich Simone, Gernot, Sebastian und Ulli, die mich während meiner gesamten Zeit in Darmstadt sowohl beruflich als auch privat begleitet und mir stets selbstlos mit einer helfenden Hand beiseite standen.

Meiner Familie (Mama, Papa, Mani, Roja, Marc, Carmen + *u know what*, Dirk, Klaus und Vera) danke ich für die große Unterstützung und das Vertrauen, das sie in mich gesetzt haben. Der Dank der Verena gilt, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

#### **8.4. Eidesstattliche Erklärung**

##### **Eidesstattliche Erklärung**

Hierdurch erkläre ich an Eides statt, dass ich bisher noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Datum: 20.09.2010

( Unterschrift )



### 8.5. Lebenslauf

<b>Name:</b>	Matin Daneschdar	
<b>Geburtsdatum:</b>	23. März 1979	
<b>Geburtsort:</b>	Göttingen	
<b>Staatsangehörigkeit:</b>	deutsch	
<b>Familienstand:</b>	ledig	
<b>Eltern:</b>	Manutschehr Daneschdar und Johanna Monika Daneschdar, geb. Mittmann	
<b>Schulbildung:</b>	<u>1984 bis 1989</u>	Grundschule Wieda im Südharz
	<u>1989 bis 1998</u>	Internatsgymnasium Pädagogium Bad Sachsa
	<u>1998</u>	Abitur am Internatsgymnasium Pädagogium Bad Sachsa
<b>Wehrpflicht:</b>	<u>1998 bis 1999</u>	in der Yorck Kaserne in Stadtoldendorf
<b>Studium der Biologie:</b>	<u>1999 bis 2005</u>	an der Georg-August-Universität zu Göttingen
<b>Diplomarbeit:</b>	<u>2004 bis 2005</u>	in der Abteilung für Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie des Instituts für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität zu Göttingen.
		Titel: „Optimierung der Präsentation von Peptiden und Proteine auf der Oberfläche von <i>E. coli</i> Zellen durch <i>Lysis Display</i> “, Gesamtnote: „gut“.
<b>Dissertation:</b>	<u>seit Oktober 2005</u>	im Clemens-Schöpf-Institut für organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt
		Titel: „Neue Wege zur rekombinanten Oligomerisierung von Peptiden und Proteinen über den mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplex“